

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**



FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA
Dipartimento di Strutture, Funzioni e Tecnologie Biologiche

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

in

Biologia, Patologia e Igiene Ambientale in Medicina Veterinaria

TRIENNIO 2005/2008

XXI° CICLO

***“MECCANISMI DI TRASFERIMENTO DELLA
COMPONENTE PROTEICA COLOSTRALE NELLA
SPECIE BUFALINA”***

Coordinatore

Ch.mo Prof. G. Paino

Tutor

Ch.mo Prof. L. Avallone

Candidata

Dott.ssa Cestaro Anna

INDICE

Premesse	<i>Pag. 1</i>
CAPITOLO 1	
INTRODUZIONE GENERALE	
1.1 <i>Cenni di anatomia e fisiologia della ghiandola mammaria nella bufala</i>	<i>Pag. 6</i>
1.2 <i>Cenni di anatomia e fisiologia del tratto gastro-intestinale del vitello bufalino.</i>	<i>Pag. 9</i>
1.3 <i>Aspetti sanitari dell'allevamento del vitello bufalino</i>	<i>Pag. 20</i>
1.4 <i>Il colostro e l'immunizzazione passiva nel vitello bufalino</i>	<i>Pag. 23</i>
1.5 <i>Il latte di bufala e la sua frazione proteica</i>	<i>Pag. 29</i>
1.6 <i>Riferimenti bibliografici</i>	<i>Pag. 33</i>
CAPITOLO 2	
SCOPO DELLA RICERCA	
2.1 <i>Linee guida della ricerca</i>	<i>Pag. 43</i>
2.2 <i>Primo step dell'indagine</i>	<i>Pag. 44</i>
2.3 <i>Secondo step dell'indagine</i>	<i>Pag. 44</i>
2.4 <i>Terzo step dell'indagine</i>	<i>Pag. 46</i>
CAPITOLO 3	
VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA DELLA GAMMA - GLUTAMILTRANSFERASI NEL TESSUTO MAMMARIO DI BUFALA	
3.1 <i>Introduzione</i>	<i>Pag.48</i>
3.2 <i>Obiettivi della ricerca</i>	<i>Pag.54</i>
3.3 <i>Materiali e Metodi</i>	<i>Pag.55</i>
3.3.1 <i>Misure sperimentali</i>	<i>Pag. 55</i>
3.3.2 <i>Raccolta dei campioni</i>	<i>Pag. 55</i>
3.3.3 <i>Determinazione dell'attività enzimatica della gamma-glutamyltransferasi in omogenati di tessuto</i>	<i>Pag. 56</i>
3.3.4 <i>Localizzazione tissutale della gamma-glutamyltransferasi</i>	<i>Pag. 56</i>
3.3.5 <i>Elaborazione statistica dei dati</i>	<i>Pag. 57</i>
3.4 <i>Risultati</i>	<i>Pag. 58</i>
3.4.1 <i>Determinazione enzimatica tissutale della gamma-glutamyltransferasi</i>	<i>Pag. 58</i>
3.4.2 <i>Localizzazione tissutale della gamma-glutamyltransferasi</i>	<i>Pag.59</i>
3.5 <i>Conclusioni</i>	<i>Pag.64</i>
3.6 <i>Riferimenti bibliografici</i>	<i>Pag. 65</i>

CAPITOLO 4

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA DELLA GAMMA-GLUTAMILTRANSFERASI NEL COLOSTRO, NEL SIERO E NEL TRATTO GASTRO-INTESTINALE DI VITELLI BUFALINI NEONATI

4.1	<i>Introduzione</i>	Pag. 70
4.2	<i>Obiettivi della ricerca</i>	Pag. 73
4.3	<i>Materiali e Metodi</i>	Pag. 74
4.3.1	<i>Misure sperimentali</i>	Pag. 74
4.3.2	<i>Raccolta dei campioni</i>	Pag. 74
4.3.3	<i>Determinazioni sieriche e colostrali dell'attività enzimatica della gamma-glutamiltransferasi</i>	Pag. 75
4.3.4	<i>Determinazione dell'attività enzimatica tissutale della gamma-glutamiltransferasi</i>	Pag. 75
4.3.5	<i>Localizzazione tissutale della gamma-glutamiltransferasi</i>	Pag. 76
4.3.5	<i>Estrazione dell'RNA, disegno dei primer e reazione di RT-PCR</i>	Pag. 76
4.3.6	<i>Elaborazione statistica dei dati</i>	Pag. 79
4.4	<i>Risultati</i>	Pag. 80
4.4.1	<i>Determinazione sieriche e colostrali dell'attività enzimatica della gamma-glutamiltransferasi</i>	Pag. 80
4.4.2	<i>Determinazione dell'attività enzimatica tissutale della gamma-glutamiltransferasi</i>	Pag. 83
4.4.3	<i>Localizzazione tissutale della gamma-glutamiltransferasi</i>	Pag. 84
4.5	<i>Real Time – PCR</i>	Pag. 101
4.6	<i>Conclusioni</i>	Pag. 105
4.7	<i>Riferimenti bibliografici</i>	Pag. 106

CAPITOLO 5

RUOLO DEL GLUTATIONE QUALE SUBSTRATO PER LA FUNZIONALITÀ DEL SISTEMA DELLA GAMMA-GLUTAMILTRANSFERASI NELLA SECREZIONE DELLA COMPONENTE PROTEICA DEL LATTE BUFALINO

5.1	<i>Introduzione</i>	Pag. 111
5.2	<i>Obiettivi della ricerca</i>	Pag. 116
5.3	<i>Materiali e Metodi</i>	Pag. 117
5.3.1	<i>Misure sperimentali</i>	Pag. 117
5.3.2	<i>Raccolta dei campioni</i>	Pag. 117
5.3.3	<i>Determinazione enzimatica della gamma-glutamiltransferasi nel colostro, nel tessuto mammario e nel siero</i>	Pag. 118
5.3.4	<i>Determinazione del glutatione nel colostro, nel tessuto mammario e nel siero</i>	Pag. 118
5.3.5	<i>Elaborazione statistica dei dati</i>	Pag. 119
5.4	<i>Risultati</i>	Pag. 120
5.4.1	<i>Determinazione dell'attività della gamma-glutamiltransferasi</i>	Pag. 120

e del glutatione nel colostro	
5.4.2 <i>Determinazione dell'attività della gamma-glutamyltransferasi</i>	<i>Pag. 121</i>
e del glutatione nel tessuto ghiandolare mammario	
5.4.3 <i>Determinazione dell'attività della gamma-glutamyltransferasi</i>	<i>Pag. 122</i>
e del glutatione nel siero di vitello bufalino neonato	
5.5 <i>Conclusioni</i>	<i>Pag. 123</i>

CAPITOLO 6

DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

6.1 <i>Analisi finale e prospettive</i>	<i>Pag. 126</i>
6.2 <i>Riferimenti bibliografici</i>	<i>Pag. 137</i>

Premesse

'a vacca pe' bellezza e a' bufala pe' ricchezza

Il bufalo¹ (*bubalus bubalis*) animale dalle origini lontanissime che ne fanno risalire il progenitore, il *Bubalus antiquus*², al Pleistocene³, era stanziato in questo periodo in Europa e Asia; le prime notizie risalenti alla presenza del bufalo in Italia sembrerebbero risalire al periodo di Agilulfo e dei Longobardi (568 a.C.), anche se alcuni Autori spostano questo evento più tardivamente in relazione al periodo Normanno⁴. Successivamente la rusticità di questo animale e nel contempo la sua scarsa domesticazione ne ha consentito un confinamento alle regioni meridionali del nostro Paese.

La capacità di sopravvivenza del bufalo nelle regioni di Terra di Lavoro⁵ sono legate al suo innato adattamento ad habitat poco ospitali, prevalentemente paludosi e ricchi di fango, in cui l'animale suole rinfrescarsi nei periodi caldi. Queste caratteristiche dapprima viste con sospetto dagli allevatori, abituati alla ben più "nobile" vacca da latte hanno consentito tuttavia uno sfruttamento zootecnico moderato e un mantenimento più oculato delle caratteristiche originarie della razza. L'allevamento bufalino ha subito una svolta di

¹ Il bufalo appartiene all'ordine Ungulati, sottordine Artiodattili, famiglia Cavicorni, genere *Bos*, sottogenere *Bubalidi*, comprendente tre distinti gruppi di specie, tra cui il *Bubalus* o *Buffalus*, al quale appartengono i bufali propriamente detti, sia selvatici che domestici. Cfr: Balanini D., 1996.

² Cfr: Duvernoy, G.L., 1851.

³ Cfr: Martínez-Navarro B. et al., 2007.

⁴ Cfr: Cimmino C., 1982.

⁵ Per Terra di Lavoro si intende una estensione geografica comprendente parte della Campania, in particolare l'alto casertano, e il basso Lazio. Ricordata da Pierpaolo Pisolini, nei versi :
La terra di Lavoro « Ormai è vicina la Terra di Lavoro, qualche branco di bufale, qualche mucchio di case tra piante di pomodoro, èdere e povere palanche. Ogni tanto un fiumicello, a pelo del terreno, appare tra le branche degli olmi carichi di viti, nero come uno scola. Dentro, nel treno che corre mezzo vuoto, il gelo ».

rinnovamento decisiva passando dalla forma tradizionale semi-selvatica ed itinerante ad una stabulazione stanziale e intensiva. Ignorato dapprima, quindi, il bufalo ha assunto sempre maggiore peso nell'economia italiana prima e mondiale poi legando la propria identità regionale e culturale alla produzione della mozzarella. Il moderno allevamento della bufala rappresenta oggi non solo un settore all'avanguardia ma anche un vanto per l'economia zootecnica meridionale. Se, come detto, la ribalta è nata per la commercializzazione della mozzarella DOP, prodotto di altissimo livello qualitativo, il mercato ha deciso di non ignorare i futuri sviluppi della vendita delle carni bufaline destinate all'alimentazione umana. Queste nuove prospettive di commercio aprono la strada ad un nuovo approccio scientifico e sanitario allo studio delle caratteristiche anatomico-fisiologiche nonché patologiche del giovane bufalo di sesso maschile; questo clima produce un fervore scientifico che scaturisce dal doversi confrontare con una realtà ancora poco conosciuta, con l'obiettivo finale di garantire la sicurezza alimentare del prodotto al consumatore sempre più esigente. Se in passato l'attenzione era incentrata esclusivamente sulla femmina produttrice di latte, ad oggi assurge ad una importanza crescente l'allevamento del vitello maschio per la produzione di carne. Pertanto, quale conseguenza dell'allevamento intensivo di questa specie, nuovi sono i problemi sanitari che il medico veterinario si trova quotidianamente a dover affrontare. Se il "barbone bufalino"^{6,7} era il cruccio del passato, le diarree neonatali⁸ rappresentano l'urgenza del momento. Recenti studi dimostrano infatti che l'insorgenza della diarrea neonatale è favorita da una serie di fattori cosiddetti predisponenti che

⁶ Cfr: Marcone G., 1862-1940.

⁷ *Nell'allevamento tradizionale e semi-selvatico del bufalo l'unica malattia veramente temuta e che produceva danni era il "barbone". Nome volgare che indicava una infezione sostenuta da Pasteurella multocida. È una malattia molto contagiosa che si manifesta con febbre elevata, perdita dell'appetito, grave depressione, difficoltà di respirazione. L'animale presenta la testa penzoloni, scolo nasale giallastro, tumefazione della gola che può estendersi al ventre e agli arti. Ne consegue una produzione gravemente compromessa con morte degli animali. Le malattie tipiche dei bovini non colpivano la bufala o erano talmente ben tollerate che l'allevatore non se ne avvedeva. Perillo riferisce un detto campano: "La bufala sta sempre bene in salute, ma quando si ammala muore" a dimostrare che le credenze popolari consideravano la bufala un animale estremamente resistente in cui le malattie si evidenziano solo con la morte dell'animale.*

⁸ *Affezioni multifattoriali che colpiscono l'apparato gastro-intestinale del vitello generando diarrea, sostenute da fattori ambientali, individuali e patogeni (Rotvirus, Coronavirus E.Coli, Salmonella, Giardia, etc.).*

agiscono sinergicamente nella patogenesi della malattia. Alla causa determinante, di natura infettiva, si sommano, quindi, quali aggravanti: la scarsa igiene degli allevamenti, la mancata o insufficiente somministrazione di colostro materno, gli elementi microclimatici sfavorevoli, la non corretta alimentazione e il cattivo management aziendale⁹. Questi aspetti non sono trascurabili se i decessi o la crescita stentata si valutano in termini di ingenti perdite economiche nel bilancio dell'allevamento. Pertanto, per la crescita ottimale sia dei vitelli destinati alla produzione di latte, sia di quelli destinati alla produzione di carne occorre fornire un management aziendale corretto al fine di assicurare tra le priorità un valido apporto alimentare. Come riportato in numerosi studi, per un corretto sviluppo del sistema immunitario del vitello bufalino si deve considerare in alto grado l'assunzione colostrale precoce, cui consegue il fisiologico sviluppo dell'apparato gastro-intestinale. È stato infatti ampiamente dimostrato che una insufficiente immunizzazione passiva, conseguente ad una inadeguata o ritardata assunzione di colostro o all'assunzione di colostro di scarsa qualità, ovvero a basso tenore anticorpale, favorisce l'insorgenze delle più comuni infezioni neonatali.¹⁰

Pertanto, una immunizzazione acquisita passivamente attraverso l'assunzione precoce di colostro materno fornisce una quota di proteine di altissimo valore biologico difficilmente sostituibili da alcun surrogato prodotto artificialmente. Un ruolo biologico fondamentale spetta dunque alla genitrice che deve essere in grado di sintetizzare e fornire questo elemento essenziale al redo, nondimeno affinché il vitello possa beneficiare di tale protezione occorre salvaguardare tutte quelle condizioni favorevoli un corretto assorbimento intestinale del colostro.

Ad oggi, i sistemi biologici coinvolti nel processo di assorbimento intestinale delle diverse componenti colostrali, in particolare delle proteine, non sono del tutto noti. Il chiarimento di tali meccanismi consentirebbe senza dubbio un miglioramento dei fattori favorevoli questo delicato processo. Pertanto, si conviene che è ipotizzabile che l'arricchimento della dieta della futura madre con quote aggiuntive di amminoacidi possa avere risvolti positivi sulla sintesi e sulla secrezione del colostro prima e del latte poi. Un incremento benché minimo della

⁹ Cfr: Janosi S. and Baltay Z., 2004.

¹⁰ Cfr: Matte J.J. et al., 1982.

frazione proteica del latte potrebbe conseguire all'*uptake* da parte dell'epitelio mammario di alcuni specifici amminoacidi che verrebbero riversati nel latte dal torrente ematico. Di contro, sono stati identificati diversi amminoacidi responsabili della ridotta sintesi di alcune proteine. Se ne deduce che esistono fattori operanti a livello di ghiandola mammaria in grado di influenzare o controllare l'*uptake* amminoacidico. Sono stati condotte diverse ricerche che hanno messo in evidenza sistemi di trasporto degli amminoacidi a livello dell'epitelio alveolare mammario e sistemi che coadiuvano la sintesi della matrice proteica, tra questi un ruolo primario spetta all'enzima gamma-glutamyltransferasi (GGT), che sembra intervenire attivamente nella regolazione della formazione delle proteine costitutive del latte e del colostro.

Sulla base di queste premesse si inserisce il nostro lavoro di ricerca, che si è proposto di valutare l'attività dell'enzima gamma-glutamyltransferasi dapprima nella ghiandola mammaria, al fine di identificarne un preciso coinvolgimento nella produzione di proteine colostrali e successivamente di indagare il comportamento di questo parametro nel tratto gastro-intestinale (GIT) del vitello bufalino neonato, con l'obiettivo finale di identificarne il potenziale ruolo o il possibile coinvolgimento nel meccanismo assorbitivo della componente proteica di origine alimentare.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE GENERALE

1.1 Cenni di anatomia e fisiologia della ghiandola mammaria nella bufala

La ghiandola mammaria è un organo costituito da tessuto secretorio, da connettivo e da adipe. La ghiandola propriamente detta è composta da cellule che attingono dal sangue gli elementi essenziali per la sintesi del latte. Lo sviluppo della ghiandola mammaria segue tappe ben precise; già a livello embrionale esistono rudimenti riconducibili ad una mammella. Nei ruminanti, essa origina da due linee ectodermiche ispessite che si estendono dalla regione toracica a quella addominale; questi cordoni mostrano degli addensamenti cellulari sferoidali, le *gemme mammarie*, da cui origineranno gli alveoli mammari e si differenzieranno le strutture definitive della ghiandola¹¹. La mammella bufalina morfologicamente è suddivisa in quattro quarti, separati tra loro da setti di tessuto connettivo; ogni quarto costituisce una unità anatomica e funzionale a se stante. La corretta morfologia della ghiandola è correlata alla sua produttività; la struttura anatomica della ghiandola mammaria richiama una disposizione arboriforme, infatti risalendo gli orifizi capezzolari si incontrano complesse strutture (dotti papillari, cisterna capezzolare, dotti galattofori, dotti terminali) che conducono agli alveoli, che costituiscono l'unità funzionale della ghiandola mammaria. Studi di microscopia elettronica mostrano come gli alveoli appaiono tappezzati da cellule secernenti a loro volta circondate da formazioni di natura mio-epiteliale. Queste strutture, che hanno una importante funzione nel meccanismo dell'eiezione latte, sono inoltre corredate da un'impalcatura vascolare di altissimo livello che assicura il transito di enormi quantità di sangue da e per la ghiandola, in virtù degli enormi consumi metabolici che essa affronta nel periodo della produzione del secreto. Risulta infatti da numerosi studi che per la produzione di 1 ml di latte, occorrono 400 ml di sangue, pertanto per una produzione media giornaliera di 35 litri di latte, occorrono 14.000 litri di sangue che transitano all'interno della trama vascolare del tessuto mammario, ovvero il 15% dell'intero lavoro cardiaco¹². Dopo la nascita, nella bufala si assiste ad uno sviluppo isometrico della mammella; questo

¹¹ Cfr: Aguggini G. et al., 1992.

¹² Cfr: Aguggini G. et al., 1992.

evento avviene fino al quinto-sesto mese di vita e comporta un aumento volumetrico della ghiandola pari a quello degli altri organi. Successivamente, fino al periodo puberale, lo sviluppo diventa allometrico, ovvero l'organo si accresce con un ritmo pari a 3.5 volte quello medio del corpo. A sostegno di questa attività mammogenica interviene l'ipofisi con la produzione di alcuni ormoni, quali la prolattina, l'ormone della crescita ed i glicocorticoidi. Dopo questo periodo si assiste ad un rallentamento della crescita della mammella. L'inizio della gravidanza costituisce una ulteriore tappa accrescitiva di notevole valore: la crescita della mammella riprende in modo elevato. Nel corso della gravidanza la mammella subisce dunque uno sviluppo definitivo; i cuscinetti adiposi lasciano spazio allo sviluppo alveolare. Anche in questo periodo si assiste ad un accrescimento di tipo allometrico, ma la buona riuscita dell'evento deve essere necessariamente sostenuto da un adeguato regime alimentare. Nel confronto bufala/vacca, appare evidente nella prima una minore proiezione anteriore della struttura ed un attacco posteriore più basso, in virtù di questa conformazione, qualora i quarti anteriori fossero più globosi, si potrebbe verificare un rilassamento dei legamenti con conseguente sbilanciamento del treno anteriore. I quarti posteriori possono fisiologicamente presentare uno sviluppo ridotto, se eccessivamente stretti risultano traballanti. Pertanto, durante la pubertà il controllo ormonale che stimola la proliferazione di tessuto mammario è deputato agli estrogeni e progestinici, mentre nel corso della gravidanza agli ormoni placentari. Lo sviluppo della ghiandola mammaria dunque appare regolato da complesse interazioni esistenti tra ormoni mammogenici e fattori di crescita locali¹³. Gli estrogeni, il progesterone e la prolattina sono senza dubbio i regolatori primari dello sviluppo ghiandolare *in vivo*, mentre il ruolo svolto dai fattori di crescita può essere considerato un valido ausilio all'attività di tali ormoni; essi si comportano infatti come mediatori efficaci della sintesi di tali sostanze¹⁴. Con il completamento della gravidanza si osserva una decisiva caduta dei valori del progesterone responsabile della inibizione della secrezione ipofisaria di prolattina, questo evento risulta fondamentale per l'innescio della lattazione. Associata a

¹³ Cfr: Imagawa W. e Pedchenko V. K., 2001.

¹⁴ Cfr: CUI YingJun e LI QingZhang, 2008.

questa circostanza si registra una influenza positiva sulla lattogenesi da parte degli estrogeni, essi difatti incidono favorevolmente sull'increzione ipofisaria di prolattina. Questo ormone, di natura polipeptidica, è sintetizzato e secreto da cellule specializzate dell'ipofisi anteriore, le *cellule lattotrope*. Questo ormone controlla l'espressione genetica della proteine del latte: è noto infatti che l'ipofisectomia di animali gravidi riduce sensibilmente l'entità della produzione latte, mentre la somministrazione di estratti della ghiandola incide sia sull'avvio che sul mantenimento della lattazione. Nella bovina la concentrazione ematica di prolattina è positivamente correlata con la produzione di latte, tuttavia numerose ricerche riferiscono che nelle specie ruminanti la lattazione è sostenuta e coadiuvata in modo significativo dall'ormone della crescita, pertanto questa duplice regolazione favorisce un indicativo decremento dei livelli di prolattina che si osservano nella fase tardiva della lattazione¹⁵. Conseguentemente al massivo sfruttamento cui è sottoposto l'organo durante la lattazione, quindi, numerosi lavori riportano l'esistenza di una particolare correlazione tra l'alimentazione e lo sviluppo accrescitivo della mammella: è noto che l'alimentazione incide sullo sviluppo accrescitivo della mammella con variazione dei tempi di accrescimento del tessuto secretorio o parenchima mammario. Pertanto, una dieta ipoenergetica somministrata nel periodo dello sviluppo, ovvero dai primi mesi di vita alla pubertà, accelera la comparsa di questo evento, di contro induce un aumento di deposizione di grassi a carico della mammella a scapito del tessuto ghiandolare. Durante la gravidanza, invece, l'accrescimento volumetrico del parenchima mammario è favorito da un piano alimentare alto¹⁶. Ulteriori studi condotti su manze Holstein con alimentazione ad libitum sia nel periodo puberale che in corso di gravidanza, suggeriscono che "l'effetto del livello nutritivo sullo sviluppo della ghiandola è determinante prima della pubertà", ovvero nel periodo pre-puberale l'accrescimento volumetrico della mammella è inversamente proporzionale a quello del tessuto secretorio, in manzette con sviluppo corporeo più veloce, perché alimentate a volontà, l'accrescimento mammario appare

¹⁵ Cfr: Aguggini G. et al., 1992.

¹⁶ Cfr: Harrison et al, 1983.

ridotto, mentre dopo la pubertà tale differenza non risulta più significativa e tende ad annullarsi¹⁷.

1.2 Cenni di anatomia e fisiologia del tratto gastro-intestinale del vitello bufalino

I poligastrici, di cui fa parte il genere *Bubalus bubalis*, si distinguono tra le specie domestiche di interesse veterinario per la complessità del loro apparato gastro-intestinale. Il comparto gastrico è costituito da tre componenti fondamentali che costituiscono i prestomaci (rumine, reticolo, omaso) e da uno stomaco propriamente detto (abomaso)¹⁸. Nel vitello, i comparti sono differentemente sviluppati rispetto all'adulto; si definisce infatti sviluppo allometrico differenziale la peculiare evoluzione del tratto gastro-intestinale, secondo la quale il rumine ed il reticolo occupano solo il 38% del complesso gastrico, mentre risulta preponderante lo sviluppo dell'abomaso (49%). Questo rapporto già all'età di 16 settimane subisce una brusca inversione: il reticolo e il rumine si espandono per il 67% mentre l'abomaso occuperà il 15% del volume totale del comparto gastrico, andando ad allineare le proprie proporzioni a quelle dell'adulto¹⁹. L'abomaso del vitello dunque risulta il solo organo funzionalmente efficiente alla nascita. Il passaggio da strutture anatomo-funzionali giovani ad adulte passa attraverso un caratteristico e delicato processo rappresentato dallo svezzamento. Con lo svezzamento, il vitello si trasforma da monogastrico funzionale a poligastrico propriamente detto, ovvero passa da una alimentazione esclusivamente latte a una solida (mangime, fieno, paglia) in maniera graduale, tale da consentire un adattamento progressivo delle strutture anatomiche che subiscono trasformazioni radicali sia dal punto di vista morfologico che funzionale²⁰. La natura, la quantità, la qualità degli alimenti introdotti con la dieta durante lo svezzamento sono fattori

¹⁷ Cfr: *Sejrsen et al, 1982.*

¹⁸ Cfr: *Succi e Hoffmann, 1997*

¹⁹ Cfr: *Ash, 1964*

²⁰ Cfr: *Parigi Bini, Someda De Marco, 1989. Monetti, 2001.*

determinanti la velocità di sviluppo dei prestomaci e saranno correlati al buono o al cattivo funzionamento dell'apparato digerente nell'adulto (*Tabella 1*).

<i>Fase</i>	<i>Evoluzione</i>
<i>Nascita</i>	Tratto gastroenterico sterile.
<i>Poche ore dopo la nascita</i>	Microflora anaerobia facoltativa o aerotollerante in massima parte, di origine sia materna (vaginale fecale, capezzoli) che ambientale.
<i>Inizio svezzamento</i>	Microflora strettamente anaerobia che raggiunge livelli di dominanza solo a livello ruminale e nel grosso intestino.
<i>Animale svezzato</i>	Microflora strettamente anaerobia ampiamente dominante, superando di 100-1000 volte quella facoltativa. La stabilità del microbiota gastroenterico si verifica solo a svezzamento concluso.

Tabella 1: Schema generale della successione microbica nel tratto gastroenterico dei mammiferi (Villa e Giardini, 2007).

Una somministrazione anticipata di alimento solido comporta un rapido accrescimento ruminale, cui consegue una attivazione fisiologica precoce²¹. Pertanto, poiché l'alimentazione del vitello neonato è esclusivamente latte, la natura ha favorito la specializzazione di una struttura anatomica che consente il transito preferenziale di questo elemento, la doccia esofagea. Essa è costituita da una plica muscolare, che estendendosi sulla superficie interna rumino-reticolare, costituisce una sorta di canale che collega direttamente l'esofago con l'ingresso dell'abomaso²². Non appena il latte viene a contatto con la parete posteriore della cavità orale e del faringe si instaura una stimolazione recettoriale che induce una chiusura transitoria della doccia per collabimento delle pliche muscolari. Questo evento impedisce dunque il transito di latte nel rumine, ancora funzionalmente inattivo, evitando fermentazioni anomale²³. L'insorgere del riflesso di chiusura della doccia esofagea è favorito e, pertanto, risulta più efficace, dall'assunzione di

²¹ Cfr: Succi e Hoffmann, 1997.

²² Cfr: Gobetto e Pellegrini, 1979.

²³ Cfr: Aguggini et al, 1992.

alimento liquido dal poppatoio rispetto all'assunzione del latte dal secchio²⁴. In particolare, studi condotti sulla postura ottimale che il vitello deve assumere per evitare lo scivolamento del latte nel comparto rumine-reticolare, evidenziano che la testa protesi in avanti e in alto, favorisce l'imbocco della doccia esofagea; questa posizione simula peraltro l'atto naturale della suzione dalla madre e ha importanti risvolti oltre che funzionali anche comportamentali²⁵. Il passaggio graduale dalla dieta latte a quella solida, contemporaneo allo sviluppo dimensionale e funzionale del rumine, inducono una riduzione graduale del riflesso di chiusura del canale esofageo²⁶. Nell'adulto è stato possibile ricreare il riflesso della doccia esofagea simulando forzatamente la poppata, col fine di introdurre specialità medicinali in forma liquida direttamente in abomaso piuttosto che disperderle a livello ruminale, dove rischierebbero di non poter esplicare la propria funzione terapeutica²⁷. Alla chiusura della doccia esofagea nell'adulto segue maturazione del comparto gastrico anteriore; a questo punto il rumine assume il suo ruolo di fermentatore e l'omaso quello di stomaco propriamente detto. Alla nascita dunque il tratto digestivo del vitello è privo di microrganismi, dopo alcune ore tuttavia essi diffondono precocemente nell'intestino. Nel corso dello svezzamento il tratto gastro-intestinale del vitello è sottoposto a modificazioni istologiche, strutturali e fisiologiche imponenti che interessano variamente lo sviluppo dei prestomaci, intervenendo sia sui meccanismi di insediamento della microflora e microfauna nel compartimento rumine-reticolo, sia sulle modalità di differenziazione delle papille della mucosa dei prestomaci, agendo dunque sul contemporaneo inizio dell'attività metabolica della mucosa stessa²⁸.

Da approfonditi studi anatomici, provengono le conoscenze relative alla struttura macro e microscopica del compartimento gastrico dei ruminanti; in particolare, è noto che l'abomaso ha una tipica forma sacciforme in cui si notano ripiegamenti dell'organo sul proprio asse longitudinale, ovvero particolare disposizione dei

²⁴ Cfr: Church, 1991.

²⁵ Cfr: Frandson, 1987. Aguggini et al, 1992.

²⁶ Cfr: Aguggini et al, 1992. Succi e Hoffmann, 1997.

²⁷ Cfr: Succi e Hoffmann, 1997.

²⁸ Cfr: Parigi Bini, Someda De Marco, 1989.

profili, dunque, che vanno a identificare una piccola ed una grande curvatura. A livello della piccola curvatura si riscontra un piccolo corridoio fiancheggiato da una coppia di pliche spiroidi che costituiscono il solco abomasale, parte abomasale della doccia esofagea. Cranialmente, l'abomaso si continua con l'omaso attraverso l'apertura omaso-abomasica, caudalmente, con il duodeno mediante il tramite di un solco pilorico che abbocca nel piloro. Strutturalmente l'abomaso vede la sovrapposizione di quattro tonache: sierosa, muscolare, sottomucosa e mucosa. La mucosa dell'abomaso si solleva in una serie di pliche permanenti che corrono dall'orifizio omaso-abomasale a quello pilorico. Esse hanno andamento a spirale (*plique spiroidi*).

Una differenziazione anatomica e funzionalmente molto significativa è evidente tra la composizione della mucosa presente nei prestomaci e quella presente a livello abomasale. Nei primi infatti la mucosa è di "tipo esofageo", ovvero costituita da epitelio pavimentoso stratificato privo di ghiandole, mentre a livello abomasale l'epitelio è di tipo prismatico semplice e risulta estremamente ricco di ghiandole. Le *ghiandole gastriche propriamente dette* comprendono una serie di quattro cellule differenti sia morfologicamente che funzionalmente. Le *cellule principali o adelomorfe* hanno l'aspetto di cellule sierose, esse sono deputate alla produzione di pepsinogeno, ovvero la sostanza che in presenza di acido cloridrico si converte in pepsina. Le *cellule parietali o delomorfe*, meno numerose e di dimensioni maggiori delle precedenti, sono disposte esternamente a queste e sono dotate di citoplasma acidofilo, probabilmente in relazione alla produzione di substrati enzimatici atti all'elaborazione dell'acido cloridrico. Le *cellule del colletto*, caratterizzate da citoplasma ricco di sostanze mucoidi, sono situate al margine tra la ghiandola gastrica e l'epitelio di rivestimento. Le *cellule argentaffini*, poco numerose, hanno questa denominazione in relazione alla loro proprietà di colorarsi di nero in presenza di Sali d'argento. Oltre alle ghiandole gastriche propriamente dette, l'abomaso ha una quota considerevole di ghiandole cosiddette piloriche, destinate a produrre un secreto neutralizzante l'acidità del succo gastrico e le ghiandole cardiali, poste in prossimità del cardias²⁹.

²⁹ Cfr: Gobetto A., Pellegrini S., 1974.

Il processo digestivo nei ruminanti comincia, dunque, nelle suddette quattro concamerazioni, che svolgono un'azione di tipo meccanico-fermentativo-enzimatica che ha un risultato di altissimo valore biologico. La digestione, pertanto, comprende una complessa serie di processi di varia natura che esita nella conversione dei principi nutritivi contenuti negli alimenti ingeriti con la dieta in piccole molecole diffusibili ed assimilabili³⁰. Questa trasformazione risulta mediata primariamente da enzimi prodotti dalle ghiandole annesse al digerente o contenute nello spessore della sua parete. Nei prestomaci, il ruolo preponderante della digestione dei foraggi, altrimenti inutilizzabili, è deputato alla imponente schiera di microrganismi ivi presenti: la *flora microbica* e la *fauna protozoaria*. Grazie a questa popolazione e al suo significato biologico, i prestomaci vengono altresì denominati camere di fermentazione, dove l'azione dei microrganismi esita in liberazione di acidi grassi volatili (*Acido Acetico* in misura del 65% circa, *Acido Propionico* in misura del 22% circa, *Acido Butirrico* in misura del 13% circa) che vengono poi assorbiti ed utilizzati a livello delle pareti di queste concamerazioni³¹.

Le fermentazioni prestomacali sono un evento dinamico che varia in relazione a diversi fattori. Inoltre, va considerata la motilità prestomacale, che ha il fine primario sia del rimescolamento, sia della propulsione anteriore delle ingesta. Nondimeno occorre non sottovalutare il ruolo fondamentale della saliva; com'è noto l'entità della salivazione è un parametro rilevante per l'effetto tampone che essa svolge, assicurando il mantenimento del pH del comparto gastrico intorno a valori stabili di 5,8 - 6,8 circa, condizione essenziale che consente la sopravvivenza dei microrganismi e l'assorbimento degli acidi grassi volatili da parte dell'epitelio ruminale. Inoltre, la quantità e la qualità degli alimenti ingeriti influenzano il numero e le specie di microrganismi e provocano altresì variazione dei rapporti di concentrazione tra gli acidi grassi volatili prodotti nel rumine. Solo dopo l'attraversamento delle prime tre concamerazioni, le ingesta sono in grado di pervenire all'abomaso, di essere sottoposte a digestione enzimatica e di essere convogliate infine nell'intestino. L'intestino tenue è essenzialmente deputato alla

³⁰ Cfr: Blum J.M., 2006.

³¹ Cfr: Aguggini et al, 1992.

digestione degli alimenti e all'assorbimento dei principi nutritivi. Si presenta nei grandi ruminanti con l'aspetto di un canale cilindrico muscolo-membranoso della lunghezza di circa 40 metri e del diametro di circa 5-6 centimetri. Si considerano nel tenue i tratti del duodeno, digiuno e ileo. Di notevole interesse è la mucosa epiteliale, di tipo prismatico semplice, i cui elementi principali sono in prevalenza rappresentati dai *microvilli*, ovvero espansioni digitiformi che nella parte libera sono provviste di una cuticola striata, mentre all'interno sono costituiti da una rete di capillari sanguigni, da un vaso chilifero e da un apparato contrattile. La funzione dominante di queste formazioni risulta quella di aumentare enormemente la superficie libera della cellula, con il compito di facilitare i processi di assorbimento. L'intestino crasso rappresenta l'ultimo tratto del canale digerente, comprende il cieco, il colon ed il retto.

Il contenuto gastrico, altresì detto *chimo*, dopo aver soggiornato nei prestomaci e nell'abomaso passa nell'intestino attraverso il piloro, viene dunque in questa sede ulteriormente sottoposto a complesse azioni di natura meccanica e chimica, che ne determinano la trasformazione in *chilo*. I movimenti presenti a livello intestinale sono di varia natura, in particolare di *natura segmentatoria*, con lo scopo di dividere il contenuto intestinale in porzioni pressoché costanti, di *natura pendolare*, con lo scopo di rimescolare e far progredire gli alimenti, infine movimenti di *natura peristaltica*, dove, tramite la progressione di un anello di contrazione, avviene un sostanziale avanzamento della massa intestinale. Nel tenue si compie la parte decisiva della digestione e ad essa partecipano con i loro importanti enzimi, il succo pancreatico ed il succo enterico, risultante del secreto delle innumerevoli ghiandole duodenali e intestinali; a questo processo partecipa inoltre la bile, la quale pur non avendo veri e propri enzimi, compie importanti funzioni demolitive, in special modo a carico della componente lipidica presente nel contenuto intestinale. Nell'intestino crasso vengono dunque completati i fenomeni digestivi ed il soggiorno dei residui alimentari³².

Se i fenomeni digestivi della componente solida dell'alimento avvengono nell'adulto sostanzialmente secondo le modalità di cui sopra brevemente accennato, nell'animale neonato, invece, in rapporto ad una alimentazione

³² Cfr: Gobetto A., Pellegrini S., 1974.

esclusivamente lattea nel periodo che va dalla nascita allo svezzamento, le modalità digestive sono essenzialmente connesse all'ingestione e al successivo assorbimento di una matrice liquida, peraltro unica nel suo genere e nella sua composizione biochimica. Tale pathway assorbitivo necessita in questa sede di ulteriori approfondimenti in relazione all'interesse suscitato proprio dalle modalità attraverso cui si esplica la digestione della componente proteica del colostro e del latte, oggetto del nostro studio sperimentale. Partendo dal presupposto che, l'habitus digestivo nei confronti del latte o di un suo succedaneo attuato dalla specie bufalina, sia a livello gastrico che intestinale, non si differenzia sostanzialmente da quello di tutti gli altri giovani mammiferi, si pone particolare rilievo alle vie biochimiche che intervengono nei processi di natura assorbitiva che si realizzano nel comparto intestinale.

Digestione delle proteine: La digestione delle proteine del latte avviene sia a livello abomasale che intestinale ed è mediata da enzimi proteolitici. L'entità della digestione dipende dal corredo enzimatico dell'animale, dalla struttura della proteina e dalla velocità di transito³³. La caseina, ovvero la componente più rappresentativa delle proteine del latte, subisce a livello abomasale una immediata coagulazione realizzata dall'HCl presente nel succo gastrico e quindi una primitiva digestione ad opera inizialmente della rennina (altresì denominata chimosina) e successivamente dalla pepsina. Nel momento in cui il latte giunge a livello abomasale attraverso la doccia esofagea, la caseina subisce fenomeni coagulativi in un tempo all'incirca di 3-6 minuti; in seguito a questo processo, il grasso viene trattenuto in questa sede, mentre il siero (sieroproteine, lattosio e acqua) viene rilasciato ed ha la possibilità di giungere direttamente a livello del compartimento intestinale. L'azione congiunta dell'acido cloridrico, della rennina o chimosina e infine della pepsina inducono quindi la prima fase di coagulazione del latte con conseguente prima digestione delle molecole proteiche³⁴. La pepsina in particolare conserva una valida attività soltanto a pH molto basso e dopo le prime settimane di vita. Le sieroproteine (albumina e globuline) invece, sfuggendo all'azione della chimosina e della pepsina, transitano inattaccate

³³ Cfr.: Succi, 1990.

³⁴ Cfr.: Succi e Hoffmann, 1997.

nell'intestino, dove subiscono l'azione della tripsina pancreatica. L'attività della tripsina pancreatica è molto bassa alla nascita ed aumenta nel corso della prima settimana. Un trattamento termico spinto delle proteine del latte o l'utilizzazione di proteine di soia o di pesce inducono una riduzione del volume del succo pancreatico e quindi dell'attività proteolitica. Peraltro, nei ruminanti è presente un enzima di natura proteolitica, la rennina, altresì anche detta *caglio*, che esercita la sua attività sulle caseine del latte determinandone, in presenza di ioni calcio, la precipitazione sotto forma di paracaseinato di calcio; si formano così dei coaguli su cui sono in grado di agire le pepsine³⁵.

È nota inoltre una relazione tra l'attività dell'enzima gamma-glutamilttransferasi e la produzione di rennina: la presenza dell'enzima GGT stimola positivamente l'attività della rennina e favorisce la trasformazione delle caseine in caglio a livello del comparto abomasale; di contro la sua assenza o la sua minore espressione avrebbe un ruolo inibitorio sulla produzione di rennina e sulla efficienza del processo coagulativo. La gamma-glutamilttransferasi svolge dunque un compito essenziale nel sostenere l'attività abomasale della rennina, in accordo con la nostra ipotesi di coinvolgimento dell'enzima nell'*uptake* amminoacidico della componente colostrale³⁶.

Nel vitello, dunque, la digeribilità delle proteine del latte risulta molto elevata, contrariamente a quella delle proteine sostitutive che di regola è decisamente inferiore³⁷. È noto che durante i primi giorni di vita del giovane bufalo, la secrezione di acido cloridrico risulta piuttosto bassa, conseguentemente il pH abomasale si mantiene in un *range* piuttosto elevato; poiché in condizioni di insufficiente acidità la pepsina risulta inattiva, è probabile che, nel corso della prima settimana di vita, la coagulazione del latte e la degradazione proteica siano assicurate dall'azione della sola chimosina, che ha la capacità di mantenersi attiva e poter agire a livelli di pH più elevato rispetto alla pepsina. In seguito poi alla riduzione del pH abomasale, la pepsina verrebbe ad affiancare gradualmente la chimosina, fino a sostituirla completamente quando il passaggio da monogastrico

³⁵ Cfr: Aguggini et al., 1992.

³⁶ Cfr: Gregory N.G., 2003.

³⁷ Cfr: Succi, 1990.

funzionale a poligastroico risulta definitivo. Peraltro, i due enzimi si caratterizzano per una diversa specificità: la chimosina risulta attiva soprattutto nei confronti della caseina, la pepsina invece risulta in grado di idrolizzare anche differenti substrati di natura proteica. La diversa attività dei due enzimi e la successione temporale con cui manifestano la loro attività giustificano, nell'animale allo stato brado, l'evento naturale della suzione del latte materno, mentre legittimano, nella pratica comune degli allevamenti di tipo industriale, la somministrazione esclusiva di latte naturale o prodotti artificiali a base di latte nei primi 7-10 giorni di vita del vitello, proprio per l'elevato contenuto in caseine di questo fondamentale nutriente. Infatti, la somministrazione massiva di proteine di diversa origine e, pertanto, incapaci di essere sottoposti a digestione enzimatica da parte della chimosina, indurrebbe la mancata coagulazione del latte, con conseguente passaggio di questo elemento indigerito nel comparto intestinale, dove sarebbe senza dubbio responsabile dell'insorgenza di sintomatologia di natura diarroica³⁸. Secondo alcune scuole di pensiero, l'assorbimento intestinale delle immunoglobuline avverrebbe prevalentemente nell'intestino tenue ed in particolare a livello duodenale, dove il tempo di permanenza prolungato ne consentirebbe un assorbimento completo³⁹.

Le macromolecole proteiche di origine colostrale giungono immutate a livello intestinale grazie alla presenza di un *fattore antitriptico* presente nel colostro stesso con funzione protettiva; questo agente inibisce selettivamente la digestione sia gastrica che enterica della componente amminoacidica⁴⁰. Pertanto, nell'intestino del vitello neonato, dopo introduzione orale del colostro o del latte, si realizza il passaggio diretto delle immunoglobuline dal comparto enterico al torrente circolatorio, attraverso processi pinocitosici operati dai villi intestinali. Nell'enterocita infatti esistono specifici recettori di membrana che in seguito al legame con le immunoglobuline si invaginano e formano delle microvescicole adibite al trasporto transmembrana dei propri costituenti. Una intensa attività della gamma-glutamyltransferasi nel duodeno e anche nel digiuno favorisce dunque un

³⁸ Cfr: Succi, 1990.

³⁹ Cfr: Aguggini et al., 1992.

⁴⁰ Cfr: Kruse P.E., 1983.

miglioramento dell'assorbimento delle immunoglobuline colostrali⁴¹. Del resto, essendo la permeabilità intestinale in progressiva riduzione dopo la nascita, si deduce che il passaggio ottimale delle immunoglobuline attraverso la barriera intestinale ed il successivo trasferimento al torrente ematico si verifichi nelle prime 24 ore che seguono questo evento⁴².

Digestione dei glucidi: Nel vitello, alla nascita, l'attività amilolitica del succo pancreatico è piuttosto scarsa, mentre aumenta a partire dai due mesi di vita. Il principale esponente della categoria dei glucidi presente nel latte è il lattosio (35-40% sul secco), si trovano in percentuali minori l'amido (2-10%) ed il saccarosio (1-2%)⁴³. Nel tratto duodenale, il lattosio è degradato da una specifica lattasi; questo zucchero è dotato già alla nascita di una elevatissima digeribilità che si aggira intorno al 99%. Di contro altri glucidi come gli amidi, i derivati amilacei (destrine, maltosio) ed il saccarosio, presenti nei latti sostitutivi presentano nei primi giorni di vita una digeribilità ridotta, che tende ad aumentare con il tempo. Pertanto, poiché il corredo enzimatico glicolitico del vitello incrementa con l'accrescimento e con lo sviluppo delle specializzazioni dei vari tratti intestinali, è usualmente consigliato prima delle otto settimane di vita di contenere l'apporto di amidi con la dieta e di fornire tali elementi entro *range* approssimativi dell'8-12% sul secco della razione. Una somministrazione eccedente tali limiti induce un accumulo di composti glucidici a livello intestinale, tale raccolta favorisce l'insorgenza di fermentazioni microbiche anomale che si rendono responsabili di forme diarroiche⁴⁴. I prodotti terminali liberati per idrolisi enzimatica del lattosio, quali glucosio e galattosio, vengono riversati nel torrente ematico velocemente, differentemente, alcuni carboidrati che sfuggono all'azione enzimatica, possono subire a livello dell'intestino crasso fermentazioni che portano alla formazione di AGV (acido acetico, acido propionico e acido butirrico), acido lattico e gas. Questi composti risultano fortemente coinvolti nel determinismo di forme

⁴¹ Cfr: Blum J. W. et al., 2000; Baumrucker C. R. et al., 1994; Hadorn U. et al., 1997; Vacher P. et al., 1993.

⁴² Cfr: Xu, R.-J., 1996.

⁴³ Cfr: Succi, 1990.

⁴⁴ Cfr: Succi e Hoffmann, 1997.

diarroiche cosiddette “alimentari”⁴⁵, conseguenti ad somministrazione eccessiva e precoce di alimenti amilacei⁴⁶.

Digestione dei lipidi: Nel comparto abomasale, i lipidi sono sottoposti ad una idrolisi parziale ad opera sia di una esterasi pregastrica salivare sia di una lipasi gastrica. Il ruolo fondamentale nel determinismo della digestione dei grassi è senza dubbio quello svolto dalla lipasi pancreatica, in grado di idrolizzare i trigliceridi in acidi grassi liberi, monogliceridi e digliceridi⁴⁷. Il compito preponderante svolto dall’esterasi pregastrica risulta quello di demolire il butirrato, elemento notevolmente presente nel grasso del latte; questa modalità assorbitiva precoce è alla base della semplicità con cui vengono assorbiti i lipidi presenti naturalmente nel latte e avvalora la difficoltà di digestione di altre tipologie di grasso quale sego, strutto, olii vegetali, addizionati ai latti sostitutivi, che risultano pertanto scarsamente digeribili.

Secreta a livello delle ghiandole salivari, l’esterasi pregastrica risulta stimolata dalla assunzione di latte, peraltro, la velocità della sua secrezione è correlata direttamente alla lentezza nell’assunzione di latte. Una buona coagulazione del latte ed una prolungata ritenzione dei coaguli a livello abomasale favorisce l’attività lipolitica di questo enzima. Di contro, tutti i fattori che accelerano il transito dei lipidi a livello intestinale, come una massiva presenza di proteine incoagulate, influiscono negativamente sulla digeribilità dei grassi⁴⁸.

La capacità assorbitiva dei lipidi dipende anche dalla natura stessa degli elementi lipidici: studi condotti di recente sostengono che acidi grassi a catena lunga e satura risultano scarsamente assimilabili. Pertanto, i lipidi presenti nel latte, che si caratterizzano per la presenza di acidi grassi a catena corta, risultano di gran lunga meglio digeribili rispetto a quelli a catena lunga, come ad esempio il sego, costituito prevalentemente da acido palmitico e stearico.

È noto che successivamente alla idrolisi che avviene a livello salivare prima e ad opera della lipasi pancreatica poi, i grassi vengono assorbiti principalmente nel

⁴⁵ La comparsa di diarree è conseguente ad una irritazione meccanica della mucosa intestinale, che comporta un incremento dell’attività peristaltica con conseguente aumento della velocità di transito; essa si rende responsabile inoltre di un aumento di escrezione di acqua (disidratazione).

⁴⁶ Cfr: Succi, 1990.

⁴⁷ Cfr: Succi, 1990.

⁴⁸ Cfr: Succi e Hoffmann, 1997.

duodeno e nel digiuno. Come nei monogastrici, i grassi non subiscono nel tratto intestinale del vitello modificazioni significative in seguito ai processi digestivi e assimilativi. Essi sono in grado di diffondere preferenzialmente nella linfa e attraverso la vena porta depositarsi come grassi corporei⁴⁹.

1.3 Aspetti sanitari dell'allevamento del vitello bufalino

La maggiore causa di perdita economica per gli allevatori è la mortalità neonatale e perinatale che si riscontra nel vitello sia bovino che bufalino; la percentuale di vitelli morti va da 8.7 a 64% circa ed è correlata positivamente sia al grado di immunizzazione passiva che alle condizioni igienico-sanitarie dell'allevamento. Un trasferimento inefficace dell'immunità anticorpale tramite colostro risulta senz'altro aggravato da una scorretta gestione dell'azienda. Una mortalità del 20% può provocare una perdita netta del profitto di una azienda con valori stimati intorno al 38%⁵⁰. Nel primo mese di vita si registra l'84% delle perdite di vitelli per decessi; di questi, ben il 75% nei primi sette giorni di vita⁵¹, mentre la restante parte entro la terza settimana⁵². Sulla base del periodo di insorgenza, le malattie più comuni nei vitelli si possono distinguere in:

- *Malattie fetali*: patologie che colpiscono il feto nella vita intrauterina; ad esempio difetti congeniti, gestazione prolungata, etc.; tali patologie spesso esitano in aborto o mortalità neonatale elevatissima.
- *Malattie della gestante*: patologie associate a distocia che provocano anossia cerebrale e alterazioni gravi dello scheletro.
- *Malattie perinatali*: patologie ad insorgenza precoce (entro le 48 ore di vita); sono secondarie a fattori materni (inadeguate cure parentali e malnutrizione), fattori ambientali (ipo e ipertermia da freddo o caldo eccessivi), fattori infettivi (colibacillosi o infezioni ombelicali).

⁴⁹ Cfr: Succi, 1990.

⁵⁰ Cfr: Blood e Radostis, 1989.

⁵¹ Cfr: Jenny et al, 1981.

⁵² Cfr: Umoh, 1982.

– *Malattie neonatali*: patologie che insorgono tra il secondo e il settimo giorno di vita, per lo più conseguenti ad assenza di cure materne cui consegue ridotta assunzione di anticorpi colostrali; il ridotto o mancato trasferimento dell'immunità passiva si rende responsabile di un aumento esponenziale della suscettibilità alle infezioni.

– *Malattie postnatali*: patologie che insorgono tra la prima e la quarta settimana di vita; sostenute da agenti infettivi e correlate ad un cattivo management aziendale (es. enterotossemie).

I fattori predisponenti le patologie del vitello lattante sono legati all'ambiente (sistema di allevamento, clima, affollamento), all'alimentazione (cambiamenti bruschi della dieta, sanità dei prodotti), alle cure dell'allevatore.

Le patologie più comunemente rilevate nell'allevamento del vitello fanno riferimento primariamente alle turbe digestive⁵³, all'immunodeficienza⁵⁴, alle patologie respiratorie⁵⁵, alle affezioni cutanee⁵⁶ conseguenti all'errato management aziendale.

Studi sull'incidenza delle patologie neonatali dimostrano che le turbe gastroenteriche hanno incidenza maggiore nei primi dieci giorni di vita e si rendono responsabili dell'80% della mortalità dei vitelli; dal 10° al 30° giorno, invece, prendono il sopravvento le patologie a carico dell'apparato respiratorio; successivamente i due tipi di patologie incidono nella stessa misura⁵⁷.

Le forme diarroiche costituiscono, dunque, una sindrome ad eziologia molto complessa, che coinvolge fattori di tipo infettivo assemblati a fattori predisponenti di tipo ambientale, nutrizionale, fisiologico e gestionale⁵⁸. Esse derivano, dunque, dalla combinazione di fattori di rischio⁵⁹ (difese inadeguate, sovraffollamento, presenza di portatori sani) e fattori determinanti la patologia (di origine batterica o virale). Per minimizzare l'incidenza di tale grave affezione, causa di elevata morbidità e mortalità neonatale, sarebbe necessario garantire un

⁵³ Cfr: Simensen e Norheim, 1983; Perez et al, 2000 ; Olson et al, 1997 ; Fedida et al., 1978.

⁵⁴ Cfr: White e Andrews, 1996.

⁵⁵ Cfr: Svensson et al, 2000.

⁵⁶ Le dermatiti sostenute da acari (rogne) e funghi (micosi) sono le più frequentemente riscontrate. Cfr: Gola, 1992.

⁵⁷ Cfr: Parigi Bini e Someda De Marco, 1989.

⁵⁸ Cfr: Khan e Khan, 1991.

⁵⁹ Cfr: De Rycke et al, 1986; Collins al, 1993.

adeguato apporto alimentare associato non secondariamente ad una corretta igiene degli allevamenti. Pertanto, le diarree risultano l'affezione che più spesso affligge i giovani vitelli, difatti nel corso delle nostre ricerche sono state incontrate di frequente e sono state fonte di esclusione di numerosi soggetti dall'iter sperimentale. Distinguiamo le diarree in forme sostenute da agenti infettivi e sostenute da agenti non infettivi.

– *Forme ad eziologia infettiva*: le turbe digestive responsabili di diarrea neonatale sono sostenute da cause infettive di origine batterica, virale e parassitaria. Gli agenti infettivi maggiormente isolati sono il *Rotavirus*⁶⁰, il *Coronavirus*⁶¹, l'*E. Coli*⁶², la *Salmonella*⁶³, il *Cryptosporidium*⁶⁴ ed il *Campylobacter*⁶⁵.

– *Forme ad eziologia non infettiva*: le turbe digestive responsabili di diarrea neonatale sono favorite da cause che predispongono l'insorgenza della malattia e che risultano di natura non infettiva. Tra queste senz'altro le più rilevanti sono da ricondurre a mancata o scarsa somministrazione colostrale, oppure a somministrazione di colostro di qualità scadente, ad errata modalità di preparazione del latte ricostituito, a scarsa igiene dell'allevamento, a somministrazione eccessiva di alimenti o a cattiva qualità di questi⁶⁶.

⁶⁰ Il rotavirus attacca le cellule epiteliali dell'intestino dove poi si replica. Si rinviene nelle feci fino alla terza settimana di vita. Cfr: Mebus et al, 1975.

⁶¹ Il coronavirus, come il rotavirus, si replica a livello di cellule epiteliali e ne provoca lo sfaldamento. Ha un'incidenza leggermente più bassa del rotavirus. Cfr: Khan e Khan, 1991; Mebus et al, 1975.

⁶² L'*Escherichia Coli* aderisce alla mucosa dove si replica; i danni maggiori sono dovuti alla liberazione di una tossina responsabile di secrezione eccessiva di fluido dalla mucosa intestinale (diarrea acquosa); è molto grave se colpisce il vitello nelle prime due settimane di vita; può restare latente e diventare serbatoio per innescare la malattia quando le difese immunitarie si abbassano e aumentano le condizioni di stress ambientale. Cfr: Moon, 1974; Barrandeguy et al, 1988.

⁶³ La salmonellosi ha una incidenza maggiore nell'allevamento bovino rispetto a quello bufalino; si rinviene dal 10° al 60° giorno di vita. Produce gastroenterite con segni di nausea, vomito. Cfr: Jones e Hunt, 1983.

⁶⁴ Parassitosi emergente nell'allevamento bufalino; l'incidenza di eliminatori di oocisti va dal 7 al 20%. Cfr: Dubey, 1992.

⁶⁵ Il *Campylobacter* è potenzialmente coinvolto nella patogenesi delle diarree, anche se alcuni autori sostengono che sia un ospite abituale della flora ruminale. Cfr: Snodgrass et al, 1986.

⁶⁶ Cfr: Gola, 1992.

1.4 Il colostro e l'immunizzazione passiva nel vitello bufalino

Il vitello bufalino alla nascita si presenta ipogammablobulinico e rasenta l'assenza assoluta di gammaglobuline. Questa scarsissima presenza anticorpale è secondaria al tipo di placentazione dei ruminanti (epitelio-coriale)⁶⁷ impermeabile quasi totalmente agli anticorpi materni⁶⁸.

L'immunità parentale è, dunque, trasmessa solo dopo la nascita con l'assunzione di colostro. Il colostro, dunque, rappresenta la secrezione della ghiandola mammaria prodotta nei primi giorni dopo il parto; altresì detto *primo latte*, anche se da questo si differenzia notevolmente, il colostro sintetizza in sé caratteristiche fondamentali, quali la presenza di anticorpi e sali minerali, l'elevatissima digeribilità, la disponibilità immediata in seguito al parto, il tutto con un ingombro minimo⁶⁹. Il colostro ha un colore bianco-giallastro, risulta più denso rispetto al latte, ha un sapore dolciastro-salato e un odore caratteristico. Esso costituisce un alimento dall'altissimo valore nutritivo: rispetto al latte risulta più digeribile, più energetico, con elevate quantità di vitamine e oligominerali, ricco di enzimi, ormoni, fattori di crescita e soprattutto immunoglobuline⁷⁰.

Le Immunoglobuline G (IgG) provenienti dal colostro bovino originano dalla componente ematica del complesso impianto vascolare della ghiandola mammaria; il passaggio delle immunoglobuline dal sangue materno al colostro avviene mediante trasporto intracellulare, mediato dalla presenza di siti recettoriali specifici per le IgG₁ e le IgG₂; in particolare, i siti per le IgG₁ risultano più numerosi e aumentano nel periodo immediatamente precedente il parto, ciò si rende responsabile di una maggiore increzione di questa componente nel colostro. Il meccanismo secretorio avviene mediante micropinocitosi: si forma una sorta di piccola cavità a livello della porzione basolaterale della cellula alveolare mammaria con formazione di micro-vescicole che viaggiano lungo tutto il citoplasma per scaricare il loro secreto a livello di membrana apicale.

⁶⁷ Classificazione secondo Grassler. Cfr: Aguggini et al., 1992.

⁶⁸ Cfr: Osburn et al, 1984.

⁶⁹ Cfr: Balasini, 1998.

⁷⁰ Cfr: Ballarini, 1987.

Le Immunoglobuline A (IgA) e le Immunoglobuline M (IgM), invece, sono sintetizzate a livello delle plasmacellule; a questo livello le IgA si legano ad un recettore di natura proteica che conferisce loro una valida protezione dall'attività proteolitica presente a livello intestinale⁷¹.

Il colostro, pertanto, grazie ai suoi importantissimi componenti svolge molteplici e fondamentali funzioni, quali:

- *Funzione energetica e nutritiva*: risulta, infatti, in grado di coprire i fabbisogni alimentari del neonato.
- *Funzione immunitaria*: per l'elevato contenuto in gammaglobuline, ovvero anticorpi.
- *Funzione lassativa*: il neonato alla nascita deve necessariamente espellere il meconio⁷² per consentire l'attivazione ed il funzionamento dell'apparato gastro-intestinale.
- *Funzione antianemica*: per la maggiore concentrazione di ferro rispetto al latte.
- *Funzione vitaminica*: l'apporto di vitamine colostrali è nettamente superiore a quella del latte; in particolare della vitamina A, la cui carenza è alla base di una maggiore recettività alle infezioni⁷³.

Il vitello nei primi 3-4 giorni di vita ha un incremento ponderale pari all'8-10% del proprio peso corporeo iniziale, ciò in ragione di una adeguata assunzione colostrale che consente il superamento del periodo di stress postnatale⁷⁴. Per questo motivo appare dunque fondamentale l'assunzione di colostro nel primo periodo di vita, allo scopo di favorire al massimo l'immunizzazione passiva⁷⁵.

È noto che la quantità totale di immunoglobuline presenti nel colostro bovino raggiunge valori compresi tra 50 e 150 mg/ml, di questi l'85-90% è rappresentato dalle IgG (di cui l'80-90% appartiene alla classe delle IgG₁), il 7% circa è rappresentato dalle IgM, il 5% dalle IgA.

⁷¹ Cfr: Aguggini et al., 1992.

⁷² Il meconio è costituito da residui di sfaldamento epiteliale e da secrezioni accumulate nel tratto gastro-intestinale durante la vita fetale. Cfr: Frandson, 1987.

⁷³ Cfr: Mornet e Espinasse, 1979.

⁷⁴ Cfr: Blum, 2006.

⁷⁵ Cfr: Kruse P.E. 1983.

Le immunoglobuline maggiormente assimilate a livello intestinale sono le IgG₁, IgG₂ e le IgM,⁷⁶. La percentuale di IgA assorbita risulta, come detto, piuttosto ridotta, conseguentemente, restando escluse dai processi assorbitivi, le IgA offrono una rilevante protezione all'epitelio intestinale, impedendo l'adesione di batteri e virus; il mancato assorbimento di questa classe di Immunoglobuline è imputabile ad una interferenza esistente tra questo gruppo di Immunoglobuline ed il normale sviluppo della flora microbica ruminale⁷⁷. L'immunoprotezione conferita dalle immunoglobuline risulta essenziale per la sopravvivenza del vitello; studi recenti sostengono che la ritardata o mancata assunzione del colostro predispone i vitelli ad infezioni talvolta mortali⁷⁸. È stato infatti ampiamente dimostrato che i neonati, privati del colostro, crescono stentatamente e presentano un indice di mortalità notevolmente elevato⁷⁹.

Le immunoglobuline, mediante un processo di micropinocitosi, entrano in circolo a partire dal piccolo intestino del vitello neonato⁸⁰; le cellule epiteliali della mucosa intestinale sono le protagoniste dell'avvenimento assimilativo; esso avviene attraverso la via linfatica e si rende massimo nel digiuno⁸¹. L'assorbimento delle diverse componenti colostrali, con particolare riferimento alle macromolecole proteiche, è di tipo non selettivo e consegue alla notevole permeabilità dell'epitelio intestinale nelle prime ore di vita. Alcuni Autori sostengono che la capacità di assorbimento è massima nelle prime ore di vita e tende a diminuire intorno alle 24-48 ore. In particolare, il picco massimo di assorbimento si verifica nelle prime 6-8 ore dopo la nascita⁸² benché sia dimostrata una elevata variabilità individuale⁸³.

La misurazione del livello di immunoglobuline colostrali presenti nel primo giorno dopo il parto risulta pari approssimativamente a 55 - 68 grammi/litro di colostro; si registra, tuttavia, un picco pari a 80 grammi/litro nella sola prima ora; a 48 ore dal parto, invece, la concentrazione di Ig subisce un decremento

⁷⁶ Cfr: Blom, 1982.

⁷⁷ Cfr: Aguggini et al., 1992.

⁷⁸ Cfr: Gregory N.G. 2003.

⁷⁹ Cfr: Matte J.J. et al., 1982.

⁸⁰ Cfr: Blood e Radostis, 1989.

⁸¹ Cfr. Aguggini et al., 1992.; Rufibach et al, 2006.

⁸² Cfr: Blom, 1982.

⁸³ Cfr: Church, 1991.

significativo del 10% circa rispetto al valore iniziale⁸⁴. Si deduce, quindi, che l'assunzione ottimale di colostro avviene solo per un breve periodo dopo la nascita⁸⁵, giacchè la capacità assorbitiva dell'epitelio intestinale si riduce drasticamente già a 12 ore dal parto, cessando totalmente tra il primo e il secondo giorno di vita⁸⁶.

Pertanto, la precocità di assunzione del colostro risulta fondamentale in quanto, non solo l'epitelio intestinale diventa refrattario all'assorbimento delle immunoglobuline colostrali dopo le prime 24 - 48 ore di vita, per di più il colostro stesso subisce una graduale trasformazione in latte perdendo le sue peculiari caratteristiche⁸⁷. L'ingestione precoce di colostro risulta dunque essenziale per il suo effettivo assorbimento e conseguentemente per la salute del vitello⁸⁸. Il ritardo nella suzione o nella somministrazione di colostro sembra effettivamente rendersi responsabile del mancato trasferimento dell'immunità passiva dalla madre al redo⁸⁹. Questo evento, per niente irrilevante e piuttosto frequente (dal 10 al 40% dei vitelli sul totale), comporta una probabilità maggiore di contrarre patologie gastrointestinali e respiratorie (20.4 vs 7.5 %) associate a ridotto incremento ponderale nei primi 28 giorni di vita o addirittura si rende responsabile di episodi di mortalità neonatale (8.3 vs 1.6%) notevolmente superiori rispetto a quelli di vitelli che hanno ingerito sufficiente colostro⁹⁰.

È noto, inoltre, che esiste una sorta di rivalità tra i microrganismi presenti a livello intestinale e le Immunoglobuline ingerite con il colostro durante il periodo massimo dell'assorbimento; si verifica, pertanto, una competizione per l'occupazione degli stessi recettori deputati al trasporto in circolo. Qualora i microrganismi mantenessero il sopravvento sui siti recettoriali, ne conseguirebbe una sindrome da malassorbimento con successiva ipo o agammaglobulinemia⁹¹. Inoltre, al fine di assicurare una buona trasmissione immunitaria, è indispensabile una ottimale modalità di somministrazione del colostro: l'allattamento naturale,

⁸⁴ Cfr: Alais, 1984.

⁸⁵ Cfr: Matte et al, 1982.

⁸⁶ Cfr: Osburn et al, 1984.

⁸⁷ Cfr: Stott G.H. et al., 1979.

⁸⁸ Cfr: Tyler et al, 1999.

⁸⁹ Cfr: Perino et al, 1995.

⁹⁰ Cfr: Wittum e Perino, 1995.

⁹¹ Cfr: Snodgrass et al, 1986.

ovvero eseguita mediante suzione diretta della mammella, consente una assunzione di colostro del 41% superiore rispetto a quella che si ottiene mediante somministrazione al secchio con succhiottino⁹². Probabilmente l'atteggiamento della suzione, che implica la postura della testa estesa sul collo, favorisce una adeguata apertura della doccia esofagea che implica una maggiore quantità di alimento ingerito.

Il vitello nelle prime 5 - 6 ore di vita dovrebbe assumere una quantità di colostro almeno pari ad 1.5 – 2.0 litri⁹³. La qualità del colostro, inoltre, costituisce un ulteriore fattore influente sulla efficienza dell'immunità passiva: è noto infatti che colostri di scarsa qualità, ovvero con un ridotto apporto di anticorpi genera una inadeguata immunizzazione passiva del vitello.

Esistono, inoltre, differenze tra la specie bovina e bufalina riguardanti la composizione strutturale e biochimica delle componenti costitutive del colostro: questa biodiversità incide fundamentalmente sulla capacità assorbitiva del piccolo intestino, organo deputato al massimo assorbimento della componente proteica. Studi riguardanti la diversa modalità di assimilazione intestinale esistente tra il vitello vaccino e bufalino sostengono infatti che la somministrazione di latte in polvere formulato per bovini ai vitelli bufalini è scarsamente valida, in quanto la caseina vaccina, formata da micelle di dimensioni più piccole, dà origine nell'abomaso del vitello bufalino ad un coagulo irregolare poco o per nulla assimilabile. Inoltre, la pratica della somministrazione di latte ricostituito non ha nel bufalo la stessa efficacia che nel bovino; infatti, gli zuccheri del latte ricostituito (amidi crudi e maltosio) restano massivamente indigeriti, conseguentemente questi elementi non solo riducono la capacità assorbitiva intestinale ma possono rendersi responsabili di diarrea fermentativa.

È noto, inoltre, che le proteine “extralatte” ovvero quelle diverse dal latte naturale (generalmente di origine vegetale) non sono digerite e vengono messe in circolo immodificate generando sostanze tossiche responsabili di fenomeni allergici⁹⁴. A

⁹² Cfr: *Levieux, 1993.*

⁹³ Cfr: *Ballarini, 1989.*

⁹⁴ Cfr: *Rania e Correale, 1982.*

questo proposito è stata dimostrata una maggiore sensibilità all'intossicazione da rame della specie bufalina rispetto a quella bovina⁹⁵.

Dopo l'assunzione di colostro, gli anticorpi trasferiti passivamente dalla madre al redo raggiungono la massima concentrazione nel torrente ematico del vitello 24 ore dopo la loro ingestione; successivamente la loro concentrazione ematica decresce sensibilmente e questo meccanismo è in relazione ad un fenomeno di diluizione cui sono sottoposte le immunoglobuline, in relazione ad un fisiologico aumento del volume della componente plasmatica del sangue del vitello in fase di accrescimento; a questo evento si associa un contemporaneo e fisiologico catabolismo cui vanno incontro gli anticorpi.

L'emivita delle immunoglobuline trasferite attraverso colostro materno si stima, infatti, di circa 21 giorni; tale valore è differente a seconda della classe anticorpale considerata, in ogni modo, tutte le immunoglobuline colostrali non risultano più reperibili nel sangue tra i 2 ed i 4 mesi di vita.

L'immunità attiva del vitello, invece, comincia a delinearsi già intorno alla seconda settimana di vita: il redo inizia in questo periodo la sintesi delle proprie IgG e intorno al quarto mese di vita vengono registrate concentrazioni ematiche di anticorpi sufficienti a generare una buona immunoprotezione. Nondimeno, in circostanze ottimali la sovrapposizione dell'immunità passiva e di quella attiva per 2-16 settimane assicura una protezione molto efficace in un periodo della vita molto delicato.

1.5 Il latte di bufala e la sua frazione proteica

Secreto mammario dall'importantissimo valore biologico, il latte è costituito essenzialmente da una soluzione acquosa di sali, carboidrati, globuli lipidici in emulsione e proteine in dispersione colloidale. Per la Legge italiana con il termine latte si indica il prodotto ottenuto dalla mungitura completa e regolare dell'apparato mammario di un animale in buone condizioni di salute e

⁹⁵ Cfr: Zicarelli *et al*, 1981.

nutrizione⁹⁶. Pertanto, il termine *latte* fa riferimento a quello di bovina, nel caso si tratti del secreto mammario di altri animali deve essere debitamente specificato sull'etichettatura del prodotto.

Nei moderni allevamenti bufalini la fase dell'allattamento naturale del vitello è praticamente scomparsa ed è stata sostituita dall'allattamento al secchio, che ha indubbi risvolti economici, giacchè il latte è la materia prima per la produzione della mozzarella. La bufala produce un latte di colore bianco neve, inodore e dal sapore delicato. La composizione chimica del latte bufalino non si discosta eccessivamente da quella del latte vaccino, in particolare, il contenuto proteico risulta maggiore nel latte bufalino rispetto a quello vaccino (8.3% vs 3.5%) così come il contenuto lipidico (4.7% vs 3.3%), (*Tabella 2*). Queste caratteristiche rendono questo latte particolarmente adatto alla caseificazione per la produzione della mozzarella, con una resa finale doppia rispetto al prodotto bovino; con la stessa quantità di latte, infatti la produzione di mozzarella di bufala si aggira mediamente intorno ai 25 Kg, contrariamente la produzione bovina si mantiene su livelli di circa 13 Kg. Differentemente dal latte vaccino, inoltre questo latte presenta una maggiore quantità di vitamina A, ma non del suo precursore, il β -carotene; l'assenza di carotenoidi inoltre si rende responsabile del caratteristico colore bianco⁹⁷. La maggior parte delle caratteristiche organolettiche della mozzarella sono attribuite alla componente lipidica, che peraltro viene utilizzata quale *marker* di genuinità di alcuni derivati (burro, mozzarella). Tali caratteristiche peculiari del prodotto sono altresì conseguenza di un maggior numero di alcuni ceppi di batteri lattici che incidono notevolmente sulla qualità microbiologica del latte bufalino, influenzando sia il fenomeno dell'acidificazione della cagliata, sia il sapore e l'odore tipici⁹⁸.

Il latte bufalino si distingue per una elevata quantità di caseina rispetto al totale azotato e per un alto tenore in acidi organici a basso peso molecolare (acidi grassi

⁹⁷ Cfr: Sciancalepore, 1998.

⁹⁸ Cfr: Contarini, 1997.

<i>Componenti</i>	<i>Bufala (%)</i>			<i>Vacca (%)</i>
	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>media</i>	<i>media</i>
<i>Residuo secco</i>	15.15	24.70	18.50	12.20
<i>Residuo magro</i>	9.15	11.70	10.20	8.70
<i>Lipidi</i>	6.00	13.00	8.30	3.50
<i>Protidi totali</i>	3.80	5.50	4.73	3.30
<i>Lattosio</i>	4.60	5.30	4.90	4.70
<i>Ceneri</i>	0.75	0.90	0.80	0.70
<i>Calcio</i>	0.18	0.21	0.20	0.12
<i>Fosforo</i>	0.10	0.13	1.12	0.09
<i>Magnesio</i>	0.14	0.16	0.15	1.10
<i>Contenuto calorico</i>	<i>Kcal</i> 950	1720	1210	690
	<i>Mj</i> 4.00	7.20	5.10	2.90

Tabella 2: Valori per singolo parametro del latte bufalino e bovino (Proto, 1995 – modificato 2002).

volatili)⁹⁹. L'elevatissimo significato biologico delle proteine provenienti dal latte deriva dal loro tenore in amminoacidi essenziali; la composizione biochimica del latte dei ruminanti vede quali protagonisti in ordine di importanza: le caseine, l' α -lattoalbumina, la β -lattoglobulina, l'albumina sierica, le immunoglobuline, la lattoferrina, la transferrina, alcuni enzimi e proteine di membrana dei globuli lipidici.

Considerata l'importanza del contenuto in proteine del latte, molti studi hanno valutato il meccanismo della biosintesi dei precursori delle proteine, ovvero gli amminoacidi, a livello di tessuto ghiandolare mammario; tali elementi chimici provengono essenzialmente dalle proteine ingerite con la dieta, progressivamente degradate e assorbite a livello intestinale e trasportate infine all'interno della cellula secretiva mammaria attraverso la parete dei capillari sanguigni con meccanismi non ancora sufficientemente chiari. Questi eventi avvengono nel

⁹⁹ Cfr: Alais, 2001.

periodo precedente al parto e sono sotto controllo ormonale; la ghiandola mammaria subisce le modificazioni morfo-strutturali che la rendono definitivamente adulta ed in grado di avviare processi di natura secretiva. L'ingresso degli amminoacidi a livello di membrana basale della cellula epiteliale mammaria avviene mediante assorbimento mediato da *carrier* posti sulla superficie della membrana, piuttosto che con semplice diffusione. Questi sistemi di trasporto risultano specifici per i singoli amminoacidi o per gruppi di essi, inoltre, è noto che alcuni trasportatori si legano preferenzialmente ad amminoacidi neutri, acidi o basici¹⁰⁰.

La conoscenza di questi meccanismi può chiarire le modalità di sintesi dei precursori del latte. Di questi sistemi, attualmente all'attenzione di numerosi studiosi è quello della gamma-glutamyltransferasi¹⁰¹.

La concentrazione transmembranaria di ioni Sodio può modulare alcuni di questi sistemi. La biosintesi delle proteine ha inizio con la messa in attività del sistema di trascrizione in RNA messaggero di geni che codificano per le proteine del latte, dopodiché l'informazione codificata dal gene viene trasportata dal nucleo alla componente ribosomiale, dove, in presenza di ATP, gli amminoacidi vengono specificamente attivati e successivamente inclusi in micro-vescicole dell'apparato del Golgi che, attraverso un meccanismo esocitosico, scaricano il contenuto vescicolare nel lume della cellula secretoria. Una tappa fondamentale attraverso cui le caseine assumono la loro struttura definitiva avviene per l'appunto all'interno di quest'ultimo organello, dove, in presenza di ioni Calcio e Fosfato inorganico, esse assumono la conformazione tridimensionale finale. L'induzione di questa tappa è sotto il controllo ormonale, primariamente della prolattina ed in misura minore dell'ossitocina e gode del tramite del Calcio. Le caseine risultano i composti maggiormente sintetizzati a livello della ghiandola mammaria; biochimicamente sono fosfoproteine distinte in varie classi (α_1 , α_2 , β e K) con elevata idrofilia conferita dalla tipica struttura micellare. La coagulazione delle caseine avviene a livello gastrico, con formazione di

¹⁰⁰ Cfr: Aguggini et al., 1992.

¹⁰¹ Cfr: Braun J.P., 1978; Center S.A., 1991; Johnston N.A., 1997. Lombardi P., Avallone L. et al., 2001.

macropeptidi che, convogliati a livello dell'intestino tenue, subiscono ulteriori processi digestivi che culminano con l'utilizzazione finale dei precursori delle proteine. Accanto alle caseine e alle proteine del siero (*α -lattoalbumine e β -lattoglobuline*), una quota minore di enzimi viene comunemente ritrovata nel latte con un ruolo non sempre definito.

1.6 Riferimenti bibliografici

- **Aguggini G., Beghelli V., Giulio L.F.:** Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. *UTET, Torino, 1992.*
- **Alais C.:** Scienza del latte. *Tecniche nuove, Milano, 717, 1984.*
- **Alais C.:** Scienza del latte: principi di tecnologia del latte e derivati. *Tecniche nuove, 2001.*
- **Ash R. W.:** Abomasal secretion and emptying in suckled calves. *J. Physiol., 172: 425-438, 1964.*
- **Balasini D.:** Zootecnica generale. *Edagricole, 1996.*
- **Balasini D.:** Zootecnica speciale. *Ed agricole, Bologna, 652, 1998.*
- **Ballarini G.:** Malattie della bovina da latte ad alta produzione “BLAP”. *Edagricole, 1987.*
- **Barrandeguy M.E., Coranaglia E.M., Gottashalk M.M., Fijtman N., Pasini M.I., Yafal A.G., Parrand J.R., Shudel A.A.:** Rotavirus, enterotoxigenic Escherichia coli and other agents in the faeces of dairy calves with and without diarrhea. *Rev Lat America Microbiol, 30: 239-245, 1988.*
- **Baumrucker C. R., Green M. H., Blum, J. W.:** Effects of dietary rhIGF-I in neonatal calves on the appearance of glucose, insulin, D-xylose,

- globulins and g-glutamyl transferase in blood. *Domest. Anim. Endocrinol.* 11: 393–403, 1994.
- **Blom J.Y.:** The relationship between serum immunoglobulin values and incidence of respiratory diseases and enteritis in calves. *Nord Vet Med*, 34: 276-284, 1982.
 - **Blood D.C., Radostis O.M.:** *Veterinary Medicine* 7th Ed, ELBS; Oxford, 1989.
 - **Blum J. W., Hammon H. M.,:** Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Lifest. Prod. Sci.*, 66:151-159, 2000.
 - **Blum J.W.:** Nutritional physiology of neonatal calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 90 (1-2): 1-11, 2006.
 - **Braun J.P., Rico A.G., Benard P.:** Tissue and blood distribution of gamma-glutamyl transferase in the lamb and in the ewe. *Res. Vet. Sci.*, 25: 37-40, 1978.
 - **Center S.A., Randolph J.F., Manwarrent T., Slater M.:** Effect of colostrum ingestion on gamma-glutamyltransferase and alkaline phosphatase activities in neonatal pups. *Am. J. Vet. Res.*, 52(3): 499-504, 1991.
 - **Church D.C.:** Livestock feeds and feeding. *Prentice hall, Englewood Cliffs*, 546, 1991.
 - **Cimmino C.:** L' allevamento bufalino in Terra di Lavoro nell' età del Risorgimento: *Atti del Secondo Convegno Internazionale sull'allevamento bufalino nel mondo, Caserta, Associazione Provinciale Allevatori*

Caserta, 98-104, 1982.

- **Collins J.K., Riegel C.A., Olson J.D.:** Shedding of enteric coronavirus in adult cattle. *Am J Vet Res*, 48: 361- 365, 1987.
- **Contarini G., Leardi R., Pezzi C., Toppino P.M.:** *Riv. Ital. Sostanze Grasse*. 70, 491-499, 1993.
- **Contarini G.:** Applicazione del metodo ufficiale della UE per la valutazione della genuinità del grasso di latte. Esperienze e suggerimenti. *Riviste Italiana delle Sostanze Grasse*, 1997.
- **CUI YingJun e LI Qing Zhang:** Effect of mammogenic hormones on the expression of FGF7, FGF10 and their receptor in mouse mammary Gland. *Sci China Ser C-Life Sci.*, 51,(8): 711-717, 2008.
- **De Rycke J., Bernard R., Laporte J.:** Prevalence of various enteropathogenes in the feces of diarrheic and healthy calves. *Annales de Recherches Veterinaires*, 17: 159-168, 1986.
- **Dubey J.P., Fayer R., Rao J.R.:** Cryptosporidial oocystis in faeces of water buffalo and zebu cattle in India. *J. Vet. Parasitol.*, 6:55, 1992.
- **Duvernoy, G.L.:** Note sur une espèce fossile de Buffle fossile (*Bubalus (Arni) antiquus*) découverte en Algérie. *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences de Paris*, 33: 595-597, 1851.
- **Fedida M., Martel J. L. :** Les avortements infectieux non brucelliques des bovins. Etiologies possibles. Techniques utilisables. *Journées d'informations des directeurs des laboratoires départementaux des Services vétérinaires, Maisons-Alfort, 1978.*

- **Frandsen R.D.:** Anatomia, fisiologia e morfologia degli animali domestici. *Edi-ermes, Milano*, 645, 1987.
- **Gobetto A., Pellegrini S.:** Anatomia e fisiologia degli animali zootecnici. *UTET*, 668, 1979.
- **Gola G.:** Patologia del vitello lattante. *Informatore zootecnico*. 34 (22): 57-61, 1992.
- **Gregory N.G. :** Effect of enhancing curd formation during the first colostrum feed in absorption of gammaglutamyltransferase by newborn calves. *Aust. Vet. J.* 81(9): 549-52, 2003.
- **Hadorn U., Hammon H., Bruckmaier R., Blum J. W.:** Delaying colostrum intake by one day has important effects on metabolic traits and on gastrointestinal and metabolic hormones in neonatal calves. *J. Nutr.* 127: 2011–2023, 1997.
- **Harrison R. D., Reynolds J. P., Little W.:** A quantitative analysis of mammary glands of dairy heifers reared at different rates of live weight gain. *Journal of Dairy Research*, 50: 405-412, 1983.
- **Imagawa W., Pedchenko V. K.:** *In vivo* inhibition of keratinocyte growth factor receptor expression by estrogen and antagonism by progesterone in the mouse mammary gland. *Endocrinol*, 171: 319-327, 2001.
- **Janosi S., Baltay Z.:** Correlation among the somatic cell count of individual bulk milk result of California Mastitis Test and bacteriological status of udder in dairy cows. *Acta vet Hung* 52(2): 173-83, 2004.
- **Jenny B.F., Cramling G.E., Glaze T.M.:** Management factors associated with calf mortality in South Carolina dairy herds. *J. Dairy Sci.* 64: 2284-

2289, 1981.

- **Johnston N.A., Parish S.M., Tyler J.W., Tillman C.B.:** Evaluation of serum gamma-glutamyltransferase activity as a predictor of passive transfer status in crias. *JAVMA*, 211(9): 1165-1166, 1997.
- **Jones T.C., Hunt R.D.:** Disease due to extraneous poisons. *Veterinary Pathology*, 1983.
- **Khan A., Khan M.Z.:** Immunoglobulins in relation to neonatal calf mortality. *Pakistan Vet.*, 11: 153-162, 1991.
- **Kruse P.E.:** The importance of colostral immunoglobulins and their absorption from the intestine of the newborn animals. *Ann. Reach. Vet.* 14 (4):349-353, 1983.
- **Levieux D., Yvon M., Vallury M.C., Pélissier J.P., Mirand P.P.:** Colostrum protein digestion in newborn lambs. *J Nutr. Mar* , 123 (3): 586-9, 1993.
- **Marcone G.:** Sulla vaccinazione del barbone bufalino. *Napoli*, 1862-1940.
- **Martínez-Navarro B., Pérez-Claros J.A., Palombo M.R., Rook L., Palmqvist P. :** The Olduvai buffalo Pelorovis and the origin of Bos. *Quaternary Research* 68: 220-226, 2007.
- **Matte, J.J., Girard C.L. Seoane, J.R.:** Absorption of colostral immunoglobulins G in the newborn dairy calf. *Journal of Dairy Science*, 65(9): 235-254, 1982.
- **Mebus C.A., Newmann L.E., Stair E.L.:** Scannino electron, light and immunofluorescent microscopi of intestines of gnotobiotic calf infected

- with calf diarrheal coronavirus. *Am J Vet Res*, 34: 1719-1726, 1975.
- **Monetti P.G.:** Allevamento dei bovini e dei suini. *Giraldi*, 391, 2001.
 - **Moon W.H.:** Pathogenesis of enteric disease caused by *Escherichia coli*. *Adv Vet Sci Comp Med*, 18: 179-211, 1974.
 - **Mornet P., Espinasse J.:** Il vitello. *Marrapese Editore DEMI srl, Roma*, 1979.
 - **Olson M.E., Thorlakson C.L., Deslliers L.:** Giardia and Cryptosporidium in Canadian farm animals. *Vet Parasitol*, 68: 375-381, 1997.
 - **Osburn B.I., MacLachlan N.J., Terrell T.G.:** Ontogeny of immune sistem. *J Am Vet Med Assoc*, 181: 1049-1052, 1984.
 - **Parigi Bini R., Someda De Marco A.:** Zootechnia speciale dei bovini. Produzione della carne. *Patron Editore, Bologna*, 253, 1989.
 - **Perez J.M., Gidenne T., Bouvarel I., Arveux P., Bourdillon A., Briens C., Le Naour J., Messenger B., Mirabito L.:** Replacement of digestible fibre by starch in the diet of the growing rabbit. II. Effects on performances and mortality by diarrhoea. *Ann. Zootech.* 49: 369-377, 2000.
 - **Perino L.J., Wittum T.E., Ross G.S.:** Effects of various risk factors and plasma protein and serum immunoglobulin concentrations of calves postpartum hours 10 and 24. *Am J Vet Res*, 56: 1144, 1995.
 - **Rania U., Correale E.:** Morbi-mortalità neonatale dei vitelli bufalini. *Obiettivi Veterinari*, 3 (11): 19-22, 1982.

- **Ridde O., Bates R.W., Dykshorn S.W.:** The preparation, identification and assay of prolactin: a hormone of anterior pituitary. *Am J Physiol.*, 105: 191-216, 1933.

- **Romano R., Lambiase G., Scalzone E.:** Analisi qualitativa-quantitativa della variabilità del grasso del latte di bufala. *Tesi sperimentale. Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Napoli, Federico II, 2003.*

- **Rufibach K., Stefanoni N., Rey-Roethlisberger V., Schneiter P., Doherr M. G., Tappy L., Blum J. W.:** Protein Synthesis in Jejunum and Liver of Neonatal Calves Fed Vitamin A and Lactoferrin. *J. Dairy Sci.*, 89:3075-3086, 2006.

- **Sciancalepore,** *Industrie agrarie, 1998.*

- **Sejrsen, K., Huber, J. T., Tucker, H. A., Akers, R. M.:** Influence of plane of nutrition on mammary development in pre- and postpubertal heifers. *Journal of Dairy Science*, 65: 783-800, 1982.

- **Simensen, E., Norheim, K.:** An epidemiological study of calf health and performance in Norwegian dairy herds. *Acta Agric. Scand.* 33: 65-74, 1983.

- **Snodgrass D.R., Terzolo H.R., Campbell D., Sherwood I., Menzies J.D., Synge B.A.:** Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet. Record.* 119: 31-34, 1986.

- **Stott G.H., Marx D.B., Menefee B.E.:** Colostral immunoglobulin transfer in calves I° period of absorption. *J Dairy Sci*, 62: 1632-1638, 1979.

- **Succi G., Hoffman I.:** La vacca da latte. *Città studi Milano*, 886, 1997.
- **Succi G.:** Zootecnica speciale. *Clesav*, 469, 1990.
- **Svensson C., Emanuelson U., Pettersson K.:** Healt status of dairy calves in individual pens or in group pens with or without automatic milk feeder. *In: Tielen M.J.M., Voest M.T. (Eds). Proceedings of the 10 International Congress on Animal Hygiene, I: 426-430, Maastricht, 2000.*
- **Tyler J.W., Hancock D.D., Parish S.M.:** Evaluation of three assays for failure of passive transfer in calves. *J Vet Int Med*, 10: 304 - 307, 1996.
- **Tyler J.W., Parish S.M., Besser T.E.:** Detection of low serum immunoglobulin concentrations in clinically-ii calves. *J Vet Int Med*, 13: 40-43, 1999.
- **Tyler J.W., Steevens B.J., Hostetler D.E.:** Colostral IgG concentration in Holstein and Guernsey cows. *Am J Vet Res* , 60: 1136- 1139, 1999.
- **Umoh J.U.:** Relative survival of calves in a university herd in Zaire, Nigeria. *British Vet. J.*, 138: 507-514, 1982.
- **Vacher P.-Y., Blum, J. W.:** Age-dependency of insulin-like growth factor I, insulin, protein and immunoglobulin concentrations and g-glutamyl transferase activity in first colostrum of dairy cows. *Milk Sci. Int.*, 48: 423–426, 1993.
- **Vina J.R., Palacin M., Puertes I.R., Vina J.:** Role of the g-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation. *The American Physiological Society*, 916-922, 1989.

- **White D.G., Andrews A.H.:** Adequate concentration of circulating colostral proteins for marker calves. *Vet. Record*, 119: 112-114, 1986.
- **Wittum T.E., Perino L.J.:** Passive immune status at postpartum hour 24 and long-term health and performance of calves. *American journal of veterinary research*, 56 (9): 1149-54. 1995.
- **Xu, R.-J.:** Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum/milk intake: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 35–48, 1996.
- **Zicarelli L., Macri A., Vittoria A., Padula P., Costantini S., Rania V., Giordano R.:** Intossicazione da rame in vitelli bufalini. *Riv. Zoot. Vet.*, 9(4): 246-251, 1981.
- **Zicarelli L.:** Atti del I Congresso nazionale sull'Allevamento del Bufalo. *Eboli (SA)*. 1-19, 2001

CAPITOLO 2

SCOPO DELLA RICERCA

2.1 Linee guida della ricerca

L'interesse suscitato dal coinvolgimento dell'enzima gamma-glutamyltransferasi nel meccanismo di sintesi della componente proteica del secreto della ghiandola mammaria, sia esso colostro o latte, ci ha indotto a valutare l'importanza che esso assume nella specie bufalina; i vitelli bufalini, dovendo assumere necessariamente tutto il corredo anticorpale tramite ingestione di immunoglobuline colostrali, si prestano quale valido modello per lo studio dei meccanismi di sintesi, nonché di trasferimento della classe proteica delle immunoglobuline.

Partendo da queste premesse, il presente lavoro sperimentale vuole essere un tentativo di comprensione dei meccanismi che regolano la sintesi dei precursori di molecole proteiche nel sito di produzione, ovvero a livello di ghiandola mammaria, ed i meccanismi fisiologici coinvolti nell'assorbimento della componente immunoglobulinica colostrale a livello intestinale. Tale studio, pertanto, si è proposto di valutare il coinvolgimento della GGT nel trasferimento di proteine dal compartimento mammario, dove vengono sintetizzate, al colostro prima e al latte poi, dove sono escrete. Sulla base di questi presupposti, la ricerca si è articolata su diverse linee:

- *Valutazione dell'attività enzimatica della γ -glutamyltransferasi nel tessuto mammario di bufala;*
- *Valutazione dell'attività enzimatica della γ -glutamyltransferasi nel colostro e nel siero di vitelli bufalini;*
- *Valutazione dell'attività enzimatica della γ -glutamyltransferasi nel tratto gastro-intestinale di vitelli bufalini neonati;*
- *Valutazione del ruolo del glutathione e sue relazioni con la γ -glutamyltransferasi nella regolazione della secrezione della componente proteica del latte di bufala.*

2.2 Primo step dell'indagine

Obiettivo primario del lavoro di ricerca è stato quello di valutare, in analogia a quanto descritto in numerosi lavori nella donna e in altre specie di interesse veterinario, la presenza della gamma-glutamyltransferasi a livello di ghiandola mammaria nella specie bufalina, in particolare in soggetti primipari in diversi stadi di lattazione; dopodichè è stato necessario verificare l'espressione, nonché localizzare la sede cellulare e tissutale di maggior rappresentazione dell'enzima, al fine di valutare la concentrazione enzimatica della GGT nel periodo successivo al parto, in relazione alla produzione di colostro. Gettate dunque le basi della nostra ricerca, si è successivamente identificata la sequenza genica dell'enzima, specifica per la specie bufalina. Queste indagini hanno avuto lo scopo di definire il ruolo svolto dalla GGT, quale modulatore della sintesi di Immunoglobuline di origine mammaria. Pertanto, nella prima fase del lavoro sperimentale ci si è proposti di identificare le relazioni intercorrenti tra i livelli anticorpali presenti nel colostro e l'espressione tissutale dell'attività dell'enzima presente nella ghiandola mammaria nelle diverse fasi della lattazione, con l'obiettivo di individuare il coinvolgimento della gamma-glutamyltransferasi nel determinismo della sintesi dei precursori della componente proteica del secreto mammario.

2.3 Secondo step dell'indagine

Nella seconda fase del nostro lavoro sperimentale il disegno sperimentale ha previsto l'analisi dei livelli sierici di gamma-globuline e di gamma-glutamyltransferasi di vitelli bufalini neonati, col fine di delineare un profilo attendibile di valutazione dell'avvenuta ingestione di colostro, mediante l'uso dell'enzima GGT. Il proposito è stato, dunque, individuare nella gamma-glutamyltransferasi un marker attendibile del trasferimento anticorpale mediante colostro.

Successivamente, l'attenzione è stata rivolta alla chiarificazione dei meccanismi assorbitivi delle immunoglobuline di origine colostrale nell'epitelio intestinale di vitelli bufalini neonati; in questo ambito è stato ipotizzato un coinvolgimento non secondario dell'enzima gamma-glutamilttransferasi nei processi biosintetici dei precursori proteici. Nei vitelli appena nati, il compartimento gastrico anteriore risulta parzialmente sviluppato, mentre il tratto intestinale è ancora immaturo; durante le prime ore di vita, infatti, si verificano intense modificazioni morfologiche e funzionali indispensabili per l'espletamento dei processi digestivi. Nei vitelli, inoltre è noto che la ritardata o mancata assunzione di colostro comporta un decisivo rallentamento dei processi maturativi a carico dell'epitelio intestinale; l'impedimento dell'acquisizione dell'immunità passiva nel vitello predispone l'animale ad infezioni gravi che possono talvolta risultare mortali. I cambiamenti anatomici, biochimici e fisiologici sono indispensabili affinché avvenga l'adattamento del vitello alla vita extrauterina¹⁰². Pertanto, se è vero che la gamma-glutamilttransferasi favorisce la formazione della componente proteica delle immunoglobuline colostrali a livello alveolare mammario, l'obiettivo successivo del lavoro di ricerca è stato quello di valutare il trasferimento dell'immunità madre-redo attraverso una interpretazione del comportamento dell'enzima gamma-glutamilttransferasi nel tessuto intestinale, organo deputato all'assorbimento delle immunoglobuline. Il successivo *iter* sperimentale ha previsto una determinazione della presenza, della localizzazione e della concentrazione di questo enzima in diversi tratti dell'apparato gastro-intestinale di vitelli bufalini lattanti a differenti età. Partendo da questi presupposti, inoltre è stata valutata l'ipotesi di individuare il sito di produzione locale della GGT ed il coinvolgimento dell'enzima nell'assorbimento intestinale della componente proteica contenuta nel colostro, sulla base delle variazioni della sua espressione in relazione all'età del vitello bufalino. Tali esperimenti sono stati condotti, inoltre, con l'obiettivo di relazionare la buona qualità del colostro con test che manifestano espressamente livelli elevati dell'enzima; conseguentemente, applicazione pratica di questo progetto sperimentale prevede la costruzione di banche di colostro di alta qualità prontamente disponibili per uso aziendale.

¹⁰² Cfr: Ruckebush Y. et al., 1983.

2.4 Terzo step dell'indagine

In ultima analisi, il lavoro di ricerca si è proposto di valutare il ruolo del glutathione, il più potente antiossidante cellulare, nella sintesi della componente proteica del secreto mammario. Essendo tale componente notoriamente presente a livello di tessuto ghiandolare mammario, questo studio ha gettato le basi per la comprensione delle relazioni intercorrenti tra l'attività dell'enzima gamma-glutamyltransferasi ed il glutathione sia a livello mammario che nel colostro, per correlare tali risultati ai livelli sierici di tale composto in vitelli bufalini neonati.

CAPITOLO 3

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA DELLA GAMMA-GLUTAMILTRANSFERASI NEL TESSUTO MAMMARIO DI BUFALA

3.1 Introduzione

La gamma-glutamyltransferasi, nota anche con l'acronimo di GGT, è un enzima¹⁰³ eterodimerico di membrana implicato nella biosintesi proteica; essa catalizza il trasferimento di un gruppo gamma glutamile da un gamma glutamil peptide ad un amminoacido o ad un altro peptide. A tal fine l'enzima utilizza il glutatione quale substato per la sintesi di nuovi amminoacidi¹⁰⁴. La GGT appartiene alla famiglia proteica delle gamma-glutamyl transferasi. Molti membri di questa famiglia non sono stati ancora completamente caratterizzati. Il gene della gamma-glutamyltransferasi codifica la trascrizione di diverse varianti. Gli studi sull'argomento suggeriscono che molti trascritti possono essere non funzionanti o rappresentano pseudogeni. I trascritti funzionanti, completamente caratterizzati sono stati raggruppati in una categoria definita gamma-glutamyltransferasi tipo I o GGT1, la cui espressione tissutale si riscontra in condizioni fisiologiche¹⁰⁵. In questo lavoro sarà presa in considerazione la caratterizzazione di questa isoforma, che verrà genericamente indicata come GGT. L'enzima ha la sua sede d'azione a livello della parte esterna della membrana cellulare, dove è in grado di reagire con amminoacidi extracellulari e con il glutatione intracellulare. Ciò conferma l'enorme significato funzionale del ciclo gamma-glutamile destinato al trasporto della componente amminoacidica per l'espletamento della sintesi proteica.

La gamma-glutamyltransferasi risulta preferenzialmente espressa a livello tissutale in organi che manifestano una intensa attività secretiva e assorbitiva. Sedi predilette sono dunque il rene¹⁰⁶, il fegato¹⁰⁷, la ghiandola mammaria¹⁰⁸,

¹⁰³ Un enzima è una molecola di natura proteica, la cui funzione consiste nel catalizzare una reazione chimica, ovvero accelerare la velocità della reazione per un raggiungimento più rapido dello stato di equilibrio termodinamico.

¹⁰⁴ Cfr: Vina J. R. et al. , 1989; Zhang H., Forman H.J., Choi J., 2006.

¹⁰⁵ Cfr: Guo-Qing Ha et al., 2003.

¹⁰⁶ Cfr: Souza J.F., 2008.

¹⁰⁷ Cfr: Souza J.F. et al., 2008; Hu G. et al., 2008.

l'apparato gastrointestinale¹⁰⁹, l'epitelio cerebro-vascolare¹¹⁰ ed i periciti¹¹¹. L'interesse clinico della determinazione sierica della gamma-glutamilttransferasi risiede nel suo incremento in corso di affezioni epatiche e delle vie biliari e solo saltuariamente in altre condizioni morbose. Gli aumenti maggiormente significativi si osservano in corso di ittero da ostruzione delle vie biliari. Al di fuori delle patologie epatobiliari, aumenti della concentrazione dell'enzima si possono osservare in corso di pancreatite¹¹² e, sebbene in grado più modesto, in corso di sindrome nefrosica¹¹³, nelle neoplasie renali¹¹⁴, nel diabete¹¹⁵ ed in patologie prostatiche¹¹⁶. La misura dell'attività sierica della GGT è stata a lungo legata nell'uomo alla caratterizzazione di un valido *marker* di patologie epatobiliari e di consumo di alcool¹¹⁷. Il reperto sierico dell'attività della gamma-glutamilttransferasi è stato studiato in altri sistemi differenti dal fegato, dove notoriamente si esprime con maggiore intensità; di fatto nella pratica clinica l'enzima viene utilizzato quale *marker* diagnostico della funzionalità epatica; ciononostante la caratterizzazione dei livelli sierici della gamma-glutamilttransferasi resta un test aspecifico, in quanto sottoposto all'azione di diversi fattori sia fisiologici che patologici¹¹⁸. Tuttavia, recenti studi suggeriscono un coinvolgimento dell'enzima quale indicatore biochimico di danno cellulare in corso di altre patologie, tra cui l'aterosclerosi¹¹⁹ ed il rischio di affezioni cardiovascolari¹²⁰. A tal proposito, occorre sottolineare che la GGT è un enzima responsabile del catabolismo extracellulare dell'antiossidante glutatione; pertanto agisce come un agente pro-ossidante nello spazio extracellulare. Quale meccanismo d'azione dell'enzima in corso di aterosclerosi, notoriamente fattore

¹⁰⁸ Cfr: Tate S.S., 1981.

¹⁰⁹ Cfr: Gardner R.B. et al., 2005; Rana S.V. et al., 2001.

¹¹⁰ Cfr: Hemmings et al., 1999.

¹¹¹ Cfr: Risau W. et al., 1992.

¹¹² Cfr: Chand K. et al., 1997.

¹¹³ Cfr: Rambabu K. et al., 1988.

¹¹⁴ Cfr: Simic T. et al., 2007; Beltran-Martinez R.J. et al., 2003.

¹¹⁵ Cfr: Kotani K. et al., 2008; Lee D.H. et al., 2008.

¹¹⁶ Cfr: Frierson H.F. et al., 1997.

¹¹⁷ Cfr: Sang Heon Song et al., 2007.

¹¹⁸ Cfr: Franzini M., 2008.

¹¹⁹ Cfr: Bozbas H. et al., 2008.

¹²⁰ Cfr: Wannamethee G. et al, 1991.

coresponsabile di danno cardiovascolare, è stata avanzata l'ipotesi che la gamma-glutamilttransferasi operi una riduzione del ferro trivalente a bivalente con rilascio di un radicale libero, in grado di ossidare successivamente la LDL¹²¹ negli spazi extracellulari¹²². Sebbene l'esatto meccanismo d'azione non sia noto, i livelli di GGT sierica potrebbero essere influenzati dal profilo lipidico e dalla resistenza all'insulina. Permangono tuttavia controversi gli studi relativi al coinvolgimento dell'enzima quale *marker* dei fattori di rischio cardiovascolari, come ad esempio l'ipertensione¹²³. Nondimeno alcuni Autori restano concordi sul coinvolgimento dell'enzima in corso di patologie cardiovascolari soprattutto nei soggetti giovani¹²⁴ e in corso di diabete mellito Tipo 2¹²⁵.

Recenti studi, inoltre, sostengono che la gamma-glutamilttransferasi sia in grado di modulare cruciali funzioni *redox*, come la difesa antiossidante/antitossica e il bilanciamento tra le fasi proliferativa e apoptotica cellulare, con potenziale implicazione nella progressione tumorale e nella resistenza ai farmaci. La GGT risulta infatti uno dei parametri clinici maggiormente correlati con la biotrasformazione, con il metabolismo degli acidi nucleici e con la genesi tumorale essendo nel contempo un sensibile *biomarker* di lesioni epatocitarie¹²⁶. Relativamente a questo meccanismo, sono attualmente in corso esperimenti che prendono in considerazione l'ipotesi di utilizzazione dell'enzima quale *marker* di stati precancerosi e cancerosi. Pertanto, il coinvolgimento dell'enzima in diversi processi di natura patologica suggerisce il suo potenziale ruolo di *target* terapeutico e *marker* diagnostico/prognostico¹²⁷.

Studi condotti su topi transgenici hanno, peraltro, esaminato il coinvolgimento dell'attività della GGT nel rimaneggiamento del tessuto osseo murino; la gamma-glutamilttransferasi sembrerebbe coinvolta nel riassorbimento osseo e quindi sembrerebbe implicata nel determinismo dell'osteoporosi. Sembra accertato,

¹²¹ Si intende per LDL (Low Density Lipoprotein, lipoproteine a bassa densità) lipoproteine caratterizzate da una densità compresa tra 1,006 e 1,063 g/ml. Trasportano trigliceridi e, principalmente, colesterolo esterificato nella circolazione, nel più ampio contesto funzionale delle lipoproteine VLDL.

¹²² Cfr.: Ruttman E. et al., 2005; Paolicchi A. et al., 1999; Frey A. et al., 1991.

¹²³ Cfr.: Caliskan M., 2007.

¹²⁴ Cfr.: Kazemi-Shirazi L., 2007.

¹²⁵ Cfr.: Tan P.C. et al., 2008.

¹²⁶ Cfr.: Whitfield JB., 2001.

¹²⁷ Cfr.: Pompella A., 2007.

dunque, un coinvolgimento dell'enzima in patologie caratterizzate da sviluppo notevole degli osteoclasti e distruzione della matrice ossea; conseguentemente a questa nuova ipotesi scientifica, la GGT si presterebbe quale valido *target* terapeutico per l'identificazione e la profilassi delle patologie della componente scheletrica dell'organismo¹²⁸.

In ambito veterinario, l'espressione dell'enzima risulta specie-specifica, nonché regolata dall'attivazione di geni associati sia allo sviluppo embrionale che alla differenziazione cellulare¹²⁹. Come detto, l'enzima è particolarmente espresso nel fegato durante il periodo perinatale; questa constatazione è risultata di estrema importanza come dato di partenza per l'esecuzione del nostro lavoro sperimentale. Infatti, il sequenziamento del gene specifico della specie bufalina che codifica per la gamma-glutamyltransferasi tipo I è stato ottenuto a partire dal fegato di vitello neonato.

Molti studi, inoltre, evidenziano una intensa attività della gamma-glutamyltransferasi a livello di epitelio mammario sia in condizioni fisiologiche che patologiche. In corso di lesioni tumorali benigne e maligne nel tessuto mammario di donna è stato accertato un incremento significativo della concentrazione dell'enzima; esso si localizza preferenzialmente a livello della faccia apicale delle cellule dell'epitelio alveolare. L'immunoreattività risulta del 100% nelle lesioni benigne, mentre in corso di iperplasie e carcinoma il valore si aggira intorno all'80-85%. Esiste inoltre una diversa localizzazione tissutale della GGT nelle varie forme di natura pre e neoplastiche; in particolare, nelle lesioni benigne si evidenzia una espressione dell'enzima maggiormente significativa a carico prevalentemente della faccia apicale delle cellule, laddove nelle lesioni maligne la distribuzione appare omogeneamente dislocata con modalità meno circoscritte a livello del citoplasma cellulare¹³⁰.

In studi condotti in ambito umano, è stata valutata l'attività della GGT in donne in allattamento ed in menopausa, con l'importante risultato di un incremento dell'attività enzimatica nella fase di allattamento ed invece una sua riduzione in

¹²⁸ Cfr: Hiramatsu K., 2007.

¹²⁹ Cfr: Rutenburg A. M. et al., 1969; Braun J. P. et al., 1978; Hanigan M. H. et al., 1996; Chikhi N. et al., 1999.

¹³⁰ Cfr.: Hanigan M. H et al., 1996.

corso di menopausa. Dunque, l'espressione tissutale dell'enzima, in conseguenza di questi dati, sembrerebbe risentire dell'influenza di alcuni ormoni, in particolare degli estrogeni¹³¹.

Molti Autori sostengono che l'incremento dell'espressione della gamma-glutamyltransferasi nel tessuto mammario adulto in fase secretiva sia correlato all'increzione delle immunoglobuline colostrali e delle proteine del latte; in particolare, sembrerebbe accertato un coinvolgimento dell'enzima nel processo di trasporto di amminoacidi dalla sede di produzione (epitelio mammario) alla sede di deposito (colostro, latte)¹³².

Numerosi Studi relativi all'espressione della gamma-glutamyltransferasi nella ghiandola mammaria, nel colostro e nel latte dei ruminanti sono stati condotti con l'intenzione di comprendere il meccanismo biosintetico delle proteine e conseguentemente di esaminare l'implicazione dell'enzima in questo processo¹³³. È noto, che un componente fondamentale del ciclo gamma-glutamilico è l'*ossiprolina*; essa, quale elemento intermedio di tale ciclo, costituisce un segnale intracellulare che stimola il trasporto degli amminoacidi. Studi effettuati sul ratto sostengono infatti che l'*uptake* degli amminoacidi risulta massimo intorno al 10 - 14° giorno di lattazione, per ridursi a valori minimi intorno al 19 - 21° giorno. Pertanto, è stato osservato che iniezioni di ossiprolina effettuate al 10° giorno di lattazione sembrerebbero indurre un aumento di questo segnale endogeno, mentre iniezioni di *antiglutina*, noto inibitore della GGT, produrrebbero una riduzione significativa dell'*uptake* degli amminoacidi e, conseguentemente, della sintesi proteica.

Numerose ricerche sono state condotte quindi sui roditori¹³⁴ e sugli ovini¹³⁵ per valutare la relazione intercorrente tra attività della gamma-glutamyltransferasi nella ghiandola mammaria e la lattazione.

Pertanto, considerando la *lattazione* quale complesso fenomeno fisiologico che prevede, sia per il suo innesco che per la sua permanenza, una serie di

¹³¹ Cfr: Hanigan M.H. et al., 1998.

¹³² Cfr: Vina J. R. et al., 2001; Pero M.E., et al., 2006.

¹³³ Cfr: Vianna de Oliveira I.M. e Fujimori E., 1996.

¹³⁴ Cfr: Pùente et al 1979; Vena et al., 1983; Siegrist et al., 1990.

¹³⁵ Cfr: Baumruker e Pocius, 1978; Johnston et al., 2004.

cambiamenti morfologico-strutturali e funzionali della mammella di notevole entità, l'organismo risponde a questa importante richiesta con un adattamento metabolico, tale da garantire un sufficiente apporto di substrati per l'espletamento delle funzioni cui la ghiandola risulterà preposta. L'*uptake* di tali substrati da parte della ghiandola mammaria dipende da diversi fattori che sinergicamente interagiscono nel determinismo della produzione di latte. Tra questi vanno annoverati: le dimensioni della ghiandola mammaria, lo stato di nutrizione dell'animale, la stagione, il sistema ormonale, la capacità intrinseca dello stesso epitelio mammario di modificarsi per effettuare la secrezione, il flusso ematico ghiandolare, la disponibilità di aminoacidi circolanti destinati ad altri tessuti ed usi, l'efficienza dei sistemi di trasporto transmembrana e non ultima l'espressione di diversi geni coinvolti nel processo di sintesi del latte. Tra questi meccanismi annoverati, un ruolo di primaria importanza riveste senza dubbio il condizionamento operato dal sistema ormonale e dall'attivazione di specifici enzimi. Studi condotti nel ratto dimostrano che l'attività della GGT nella ghiandola mammaria subisce un incremento significativo nel corso della gravidanza e, in particolare, un picco viene registrato nel primo periodo della lattazione¹³⁶. È dimostrato, peraltro, che l'attività dell'enzima è sotto il controllo del lattogeno placentare e della prolattina¹³⁷. A tal proposito si inseriscono numerosi lavori che avvalorano la tesi secondo la quale la gamma-glutamyltransferasi rivesta un ruolo di grande interesse nel trasporto di aminoacidi e quindi nella biosintesi della componente proteica del colostro e del latte¹³⁸.

¹³⁶ Cfr: Puente J. A. et al., 1979; Pocius P. A. et al., 1980.

¹³⁷ Cfr: Bussman L. E. e Deis R. P., 1984.

¹³⁸ Cfr: Vina et al., 2001.

3.2 Obiettivi della ricerca

Gli obiettivi di questo studio si inseriscono in una linea di ricerca il cui fine è quello di individuare il ruolo dell'enzima gamma-glutamyltransferasi a livello di tessuto alveolare mammario in bufale in differenti periodi di lattazione; ciò al fine di ipotizzare il coinvolgimento di questo sistema enzimatico nel processo di uptake dei precursori delle proteine, gli amminoacidi e successivamente di secrezione del secreto mammario. L'individuazione del sito di espressione dell'enzima e la quantificazione dell'intensità della sua attività nell'epitelio della ghiandola mammaria sono stati, pertanto, il punto di partenza del nostro lavoro sullo studio dei meccanismi implicati nella secrezione della componente proteica del colostro e del latte.

3.3 Materiali e Metodi

3.3.1 Misure sperimentali

Nella prima fase dell'indagine, le bufale oggetto di studio sono state sottoposte ad esame clinico prima della macellazione. Inoltre, sono state escluse dalla sperimentazione le femmine gravide. Al fine di valutare la sanità della ghiandola mammaria sono stati prelevati campioni di latte e saggiati con il *California Mastitis Test*; la presenza di reperti patologici ha determinato la non idoneità del secreto e quindi l'esclusione dalla sperimentazione di alcuni soggetti. Sono state effettuati campionamenti da tessuto mammario da tutte le femmine considerate idonee in ognuno dei tre gruppi. Per questo scopo, la ghiandola mammaria è stata suddivisa lungo la linea mediana e sono stati prelevati frammenti tissutali dalla porzione centrale di ogni ghiandola. Residui di tessuto connettivo e adiposo sono stati adeguatamente allontanati. Tali reperti sono stati classificati, aliquotati e immediatamente stoccati a idonea temperatura di conservazione (-170°C).

3.3.2 Raccolta dei campioni

La raccolta dei campioni è stata effettuata presso tre aziende site in provincia di Caserta e Salerno nel periodo giugno 2006- giugno 2008. In questi allevamenti sono stati selezionati gli animali oggetto della sperimentazione. Nel protocollo sperimentale sono state inserite 40 bufale in lattazione, che sono state assegnate a tre differenti gruppi sperimentali, omogenei per numerosità, peso medio, condizioni di alimentazione e stabulazione:

- *Gruppo A*: femmine nel primo periodo di lattazione (0-120 giorni);
- *Gruppo B*: femmine nel secondo periodo di lattazione (121-270 giorni);
- *Gruppo C*: femmine non in lattazione.

3.3.3 Determinazione dell'attività enzimatica della gamma-glutamyltransferasi in omogenati di tessuto

I campioni di tessuto ghiandolare mammario sono stati congelati su ghiaccio, lavati con soluzione fisiologica, dopodichè ridotti in frammenti di piccolo diametro e sottoposti ad omogeneizzazione¹³⁹ nella quantità di 1gr/4 ml di PBS. Gli omogenati così ottenuti sono stati centrifugati a 3000 X/g per 15 minuti. Il sopranatante è stato utilizzato per le analisi. Per la valutazione della concentrazione dell'enzima negli omogenati di tessuto è stato utilizzato TRIS buffer pH 8.25, 100mmol/L addizionato con glicilglicina 100 mmol/L a cui veniva aggiunto il campione e L-g-glutamyl-3-carboxy-p-nitroanilide in qualità di attivatore della reazione. L'attività della gamma-glutamyltransferasi è stata valutata con procedura cinetica¹⁴⁰. È stata effettuata una lettura spettrofotometrica¹⁴¹ ad una lunghezza d'onda di 405 nm¹⁴². La concentrazione della GGT è stata espressa in UI/gr di tessuto.

3.3.4 Localizzazione tissutale della gamma-glutamyltransferasi

Sono stati effettuati saggi di istochimica con lo scopo di localizzare con esattezza i siti di maggiore espressione dell'attività della gamma-glutamyltransferasi nell'epitelio ghiandolare mammario. Pertanto, sono state ottenute al criostato sezioni di 4-8 micron, montate su vetrini pretrattati con silano. Dopodichè le

¹³⁹ Rico A. G., et al., 1983.

¹⁴⁰ Principio del metodo: la gamma-glutamyltransferasi catalizza il trasferimento del gruppo gamma-glutamile da un gamma-glutamyl-p-nitroanilide al dipeptide accettore glicilglicina, secondo la seguente reazione:

$\gamma\text{-L-Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide} + \text{Glycylglycine} \rightarrow (\gamma\text{-GT}) \rightarrow \gamma\text{-Glutamyl-glycylglycine} + 2\text{-Nitro-5-aminobenzoic acid}$

La velocità di formazione dell'acido 2-Nitro-5-aminobenzoico, misurato spettrofotometricamente, è proporzionale alla concentrazione catalitica della gamma-glutamyltransferasi presente nel campione. (SPINREACT, S.A. Spain)

¹⁴¹ Lo spettrofotometro è un fotometro, ovvero un dispositivo per la misurazione dell'intensità luminosa. Esso determina l'intensità in funzione della lunghezza d'onda dell'intensità luminosa Spettrofotometro Perkin Elmer.

¹⁴² L'unità di misura con cui è espressa la lunghezza d'onda è la Densità Ottica (OD).

sezioni di tessuto sono state trattate secondo protocollo¹⁴³ al fine di individuare i siti di espressione dell'enzima. Infine, ogni sezione è stata esaminata al microscopio ottico a diversi ingrandimenti; i reperti maggiormente significativi sono stati fotografati e archiviati.

3.3.5 Elaborazione statistica dei dati

Tutti i risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard ($M \pm SD$). Le differenze all'interno del gruppo sono state calcolate tramite one-way ANOVA¹⁴⁴. Ogni test è stato eseguito in duplicato e la media dei risultati è stata utilizzata per il calcolo. Le differenze sono state considerate significative per $P < 0.01$.

¹⁴³ Le sezioni sono state essiccate all'aria, poi fatte incubare a 25° C nella seguente soluzione preparata a fresco: gamma-glutamyl-metossi-2-naftilamide (GMNA), 2.5 gr/ml di tris buffer (0.1M) pH 7.4, soluzione salina (0.85%), glicilglicina, blu forte (diazotized 4'-amino-2',5'-diethoxybenzylide-BBN). Dopo 30 minuti di incubazione, le sezioni venivano trasferite in una soluzione di solfato cuprico 0.1M per 2 minuti. Successivamente a lavaggi, le sezioni sono state essiccate e montate in PBS-glicerolo (Cfr: Rutenburg A.R. et al., 1969). Infine è stata eseguita una colorazione di contrasto con ematossilina al fine di evidenziare i nuclei.

¹⁴⁴ SAS Institute Inc.

3.4 Risultati

3.4.1 Determinazione enzimatica tissutale della gamma-glutamilttransferasi

La nostra indagine ha valutato la cinetica dell'enzima gamma-glutamilttransferasi in tutti i campioni di tessuto ghiandolare mammario sottoposti a sperimentazione; pertanto, l'attività della GGT è risultata presente in tutti e tre i gruppi di bufale sottoposte a sperimentazione. Cionondimeno, è stata osservata una espressione massima dell'enzima nel gruppo di animali che si trova nella prima fase di lattazione stimata da 0 a 120 giorni (*Gruppo A*). Tra il gruppo nella fase finale della lattazione (*Gruppo B*) e il gruppo di controllo (femmine prepuberi - *Gruppo C*) non sono state riscontrate differenze significative, sebbene residuasse una minima attività della GGT in entrambi i gruppi (*Figura 1*).

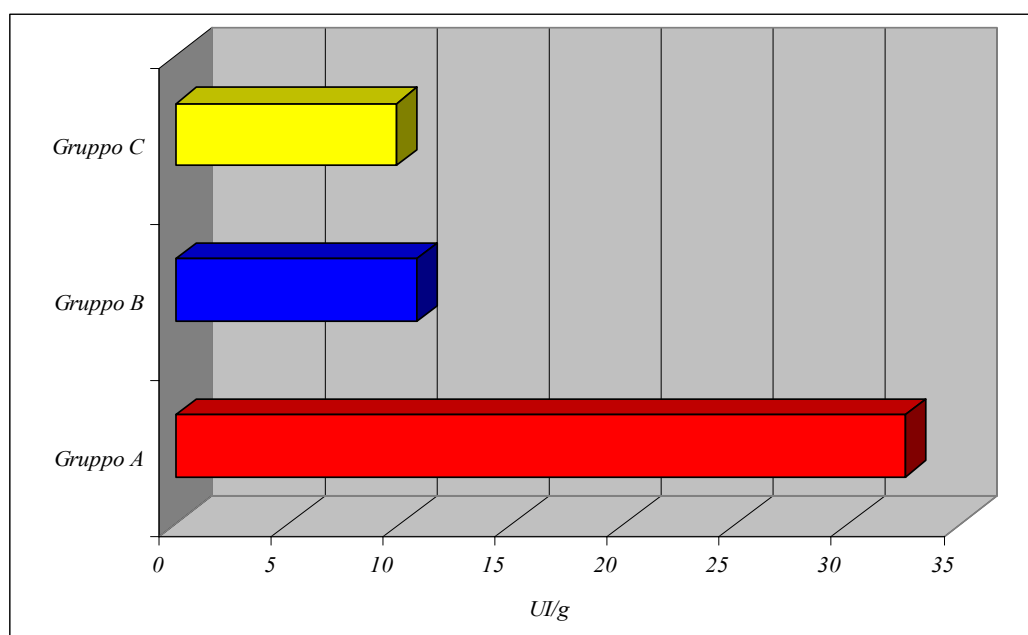


Figura 1: Attività della gamma-glutamilttransferasi nei gruppi sperimentali.

Gruppo A : 32.57 ± 7.41 U/g - Gruppo B: 10.76 ± 3.6 U/g - Gruppo C: 9.86 ± 7.94 U/g

3.4.2 Localizzazione tissutale della gamma-glutamyltransferasi

La reazione di Istochimica ha palesemente rivelato una intensa attività dell'enzima gamma-glutamyltransferasi nelle cellule epiteliali degli alveoli mammari presenti nelle sezioni ottenute dai campioni appartenenti alla prima fase di lattazione (*Gruppo A*). Cionondimeno, tutte le cellule epiteliali degli alveoli, sebbene con intensità diversa, si presentano reattive. La presenza dell'enzima è espressa nel citoplasma di queste cellule con formazioni granulari di colore rosso porpora (*Figura 2*).

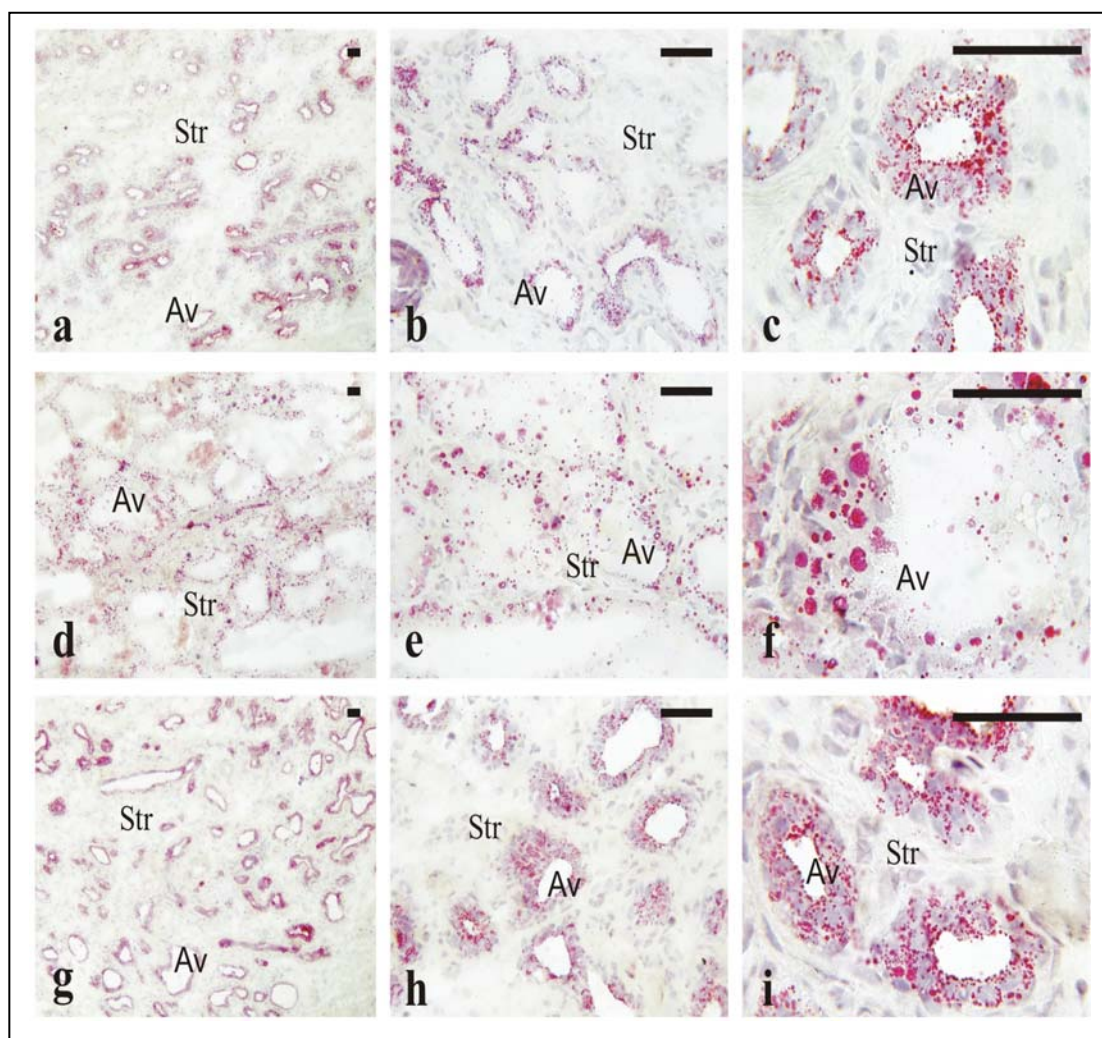


Figura 2: Espressione dell'enzima gamma-glutamyltransferasi nel tessuto mammario.
Dove a, b, c, rappresentano i campioni del Gruppo C a 10x, 40x e 100x rispettivamente;
Dove d, e, f, rappresentano i campioni del Gruppo A a 10x, 40x e 100x rispettivamente;
Dove g, h, i, rappresentano i campioni del Gruppo B a 10x, 40x e 100x rispettivamente.

Nei preparati appartenenti al primo gruppo di sperimentazione (*Gruppo A*), effettuando una accurata osservazione dell'intera sezione, si può constatare che i granuli hanno differenti dimensioni; risultano predominanti i granuli di maggiore estensione, largamente distribuiti nell'ambito del citoplasma cellulare (*Figura 3*).

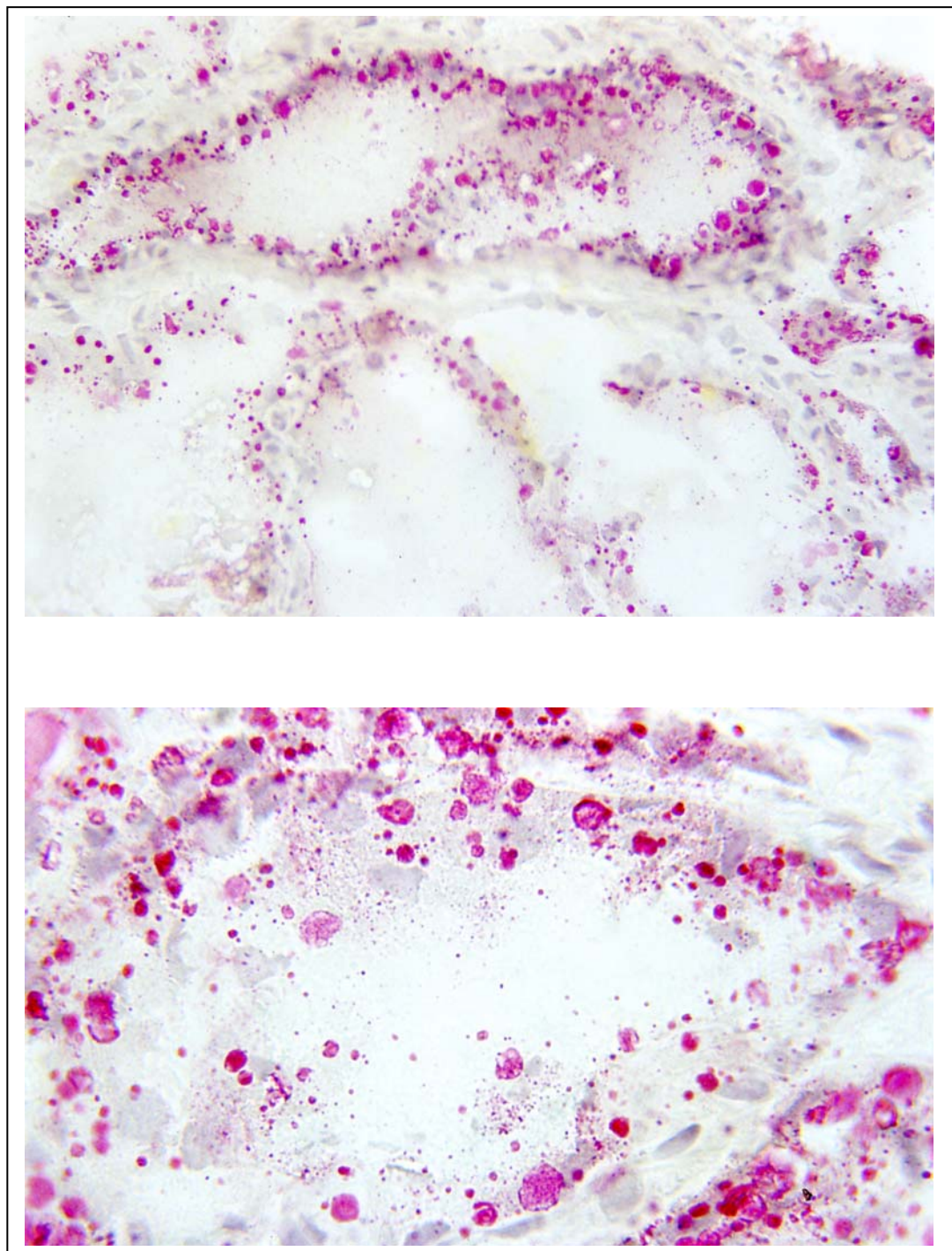


Figura 3: Espressione dell'enzima gamma-glutamyltransferasi nel Gruppo A (ingrandimento 10x e 40x rispettivamente).

L'espressione tissutale della gamma-glutamilttransferasi nel gruppo di campioni nella seconda fase di lattazione (*Gruppo B*), (*Figura 4*) e nel gruppo di controllo (femmine prepuberi - *Gruppo C*) appare notevolmente ridotta rispetto al *Gruppo A*.

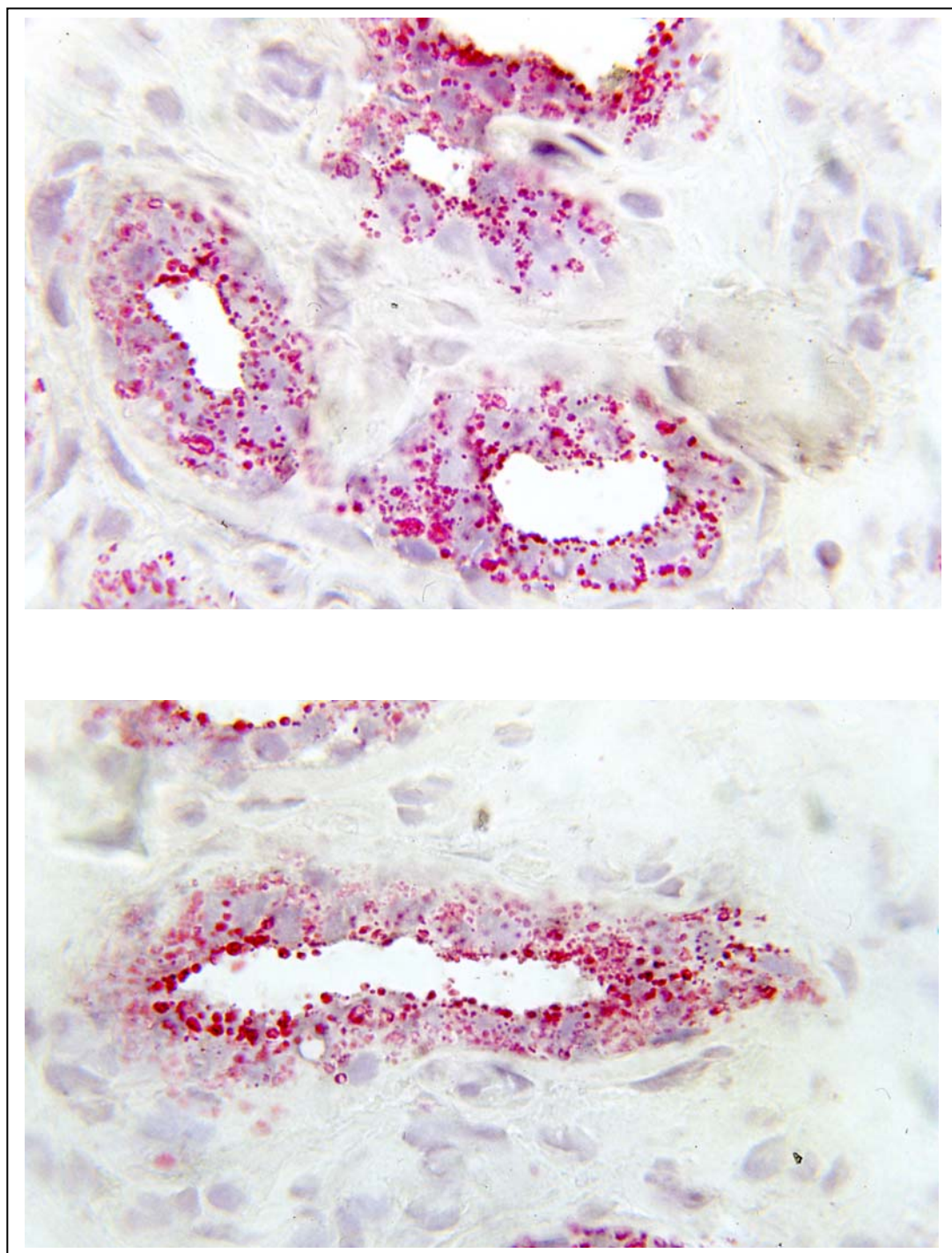


Figura 4: Espressione dell'enzima gamma-glutamilttransferasi nel Gruppo B (ingrandimento 10x e 40x rispettivamente).

Un costante reperto evidenziato nelle sezioni dei *Gruppi B e C* è l'incremento della presenza della componente stromale a scapito del tessuto alveolare; gli alveoli peraltro si presentano più piccoli e contratti (*Figura 5*).

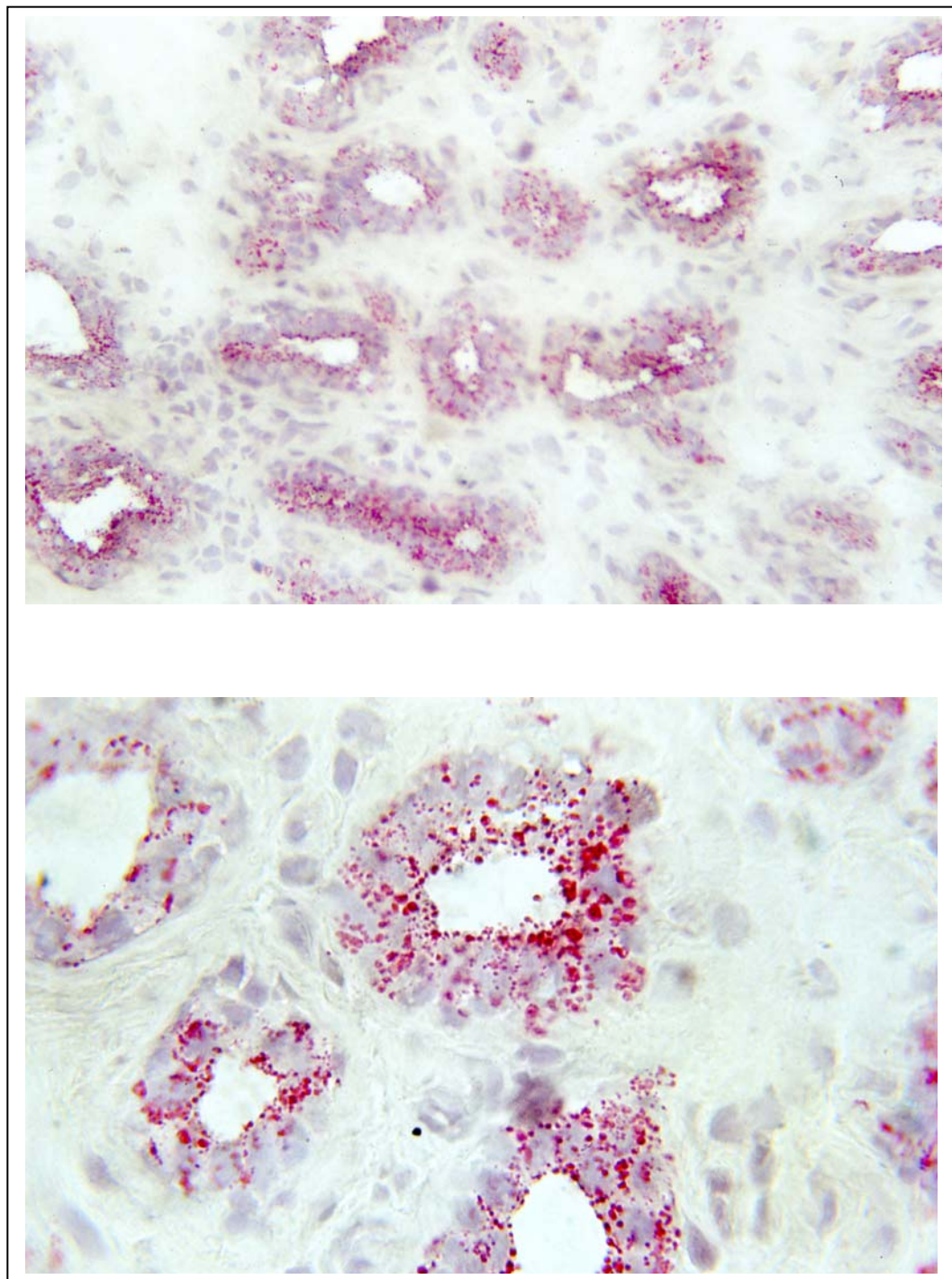


Figura 5: Espressione dell'enzima gamma-glutamyltransferasi nel Gruppo C in alto e nel gruppo B in basso.

Le cellule alveolari mostrano una differente risposta reattiva: è possibile infatti osservare cellule che presentano granuli reattivi rispetto ad altre che non ne hanno alcuno. Nelle cellule reattive i granuli appaiono disposti intorno al nucleo. Negli alveoli dei campioni non in lattazione ed in quelli in fase tardiva di lattazione (*Gruppi B e C*) i granuli si presentano omogeneamente reattivi, sebbene siano di dimensioni notevolmente ridotte rispetto a quelli evidenziati nelle cellule delle femmine nella prima fase di lattazione (*Gruppo A*). Queste differenze volumetriche riscontrate per i granuli dei tre diversi gruppi di campioni sono attribuibili ad una diversa intensità della reazione enzimatica avvenuta in soggetti che si trovano in differenti stadi fisiologici (inizio e fine lattazione, prepuberi) in cui morfologicamente si apprezza una diversa composizione tra la componente alveolare e la componente stromale. Pertanto, una aumentata reattività enzimatica degli alveoli mammari nella fase di massima secrezione lattea ovvero nella fase in cui non solo il latte è quantitativamente più abbondante, ma anche qualitativamente più efficiente, sembra giustificare una relazione intercorrente tra l'entità delle sintesi proteiche e l'espressione dell'enzima.

3.5 Conclusioni

La presenza di una intensa attività dell'enzima gamma-glutamilttransferasi nella ghiandola mammaria suggerisce il coinvolgimento dell'enzima dei meccanismi che presiedono alla formazione del secreto mammario. In particolare, la massima attività dell'enzima, riscontrata nel picco massimo di produzione lattea, sembra palesemente indicare un coinvolgimento dell'enzima nella produzione di colostro e latte nei periodi in cui questi elementi non solo risultano quantitativamente più abbondanti, ma anche qualitativamente di maggior pregio. Pertanto, essendo noto che il colostro contiene in maggior misura immunoglobuline e che il latte nel primo periodo della lattazione risulta considerevolmente abbondante nella sua frazione proteica, ciò ci induce a supporre un coinvolgimento dell'enzima gamma-glutamilttransferasi nel *pathway* proteico della sintesi di colostro e di latte nella bufala.

3.6 Riferimenti bibliografici

- **Baumrucker C.R., Pocius P.A.:** Gamma - glutamyl transpeptidase in lactating mammary secretory tissue of cow and rat. *Journal of Dairy Science* 61:309-314, 1978.
- **Braun JP, Bezille P., Rico AG.:** Biochemical semiology of liver in ruminants. *Reprod. Nutr. Dev.* 26(1B): 227-43, 1986.
- **Caliskan M, Erdogan D, Gullu H, Ciftci O, Yildirim I, Baycan S, Yildirim A, Muderrisoglu H.:** Association between serum gamma-glutamyltransferase levels and coronary microvascular function in hypertensive patients. *J Hypertens.* 25 (12) : 2497-503, 2007.
- **Chikhi Naima, Holic Nathalie, Guellaen Georgies, Laperche Yannick :** Gamma-glutamyltranspeptidase gene organization and expression: a comparative analysis in rat, mouse, pig and human species. *Comparative biochemistry and physiology Part B* 122, 376-380, 1999.
- **Franzini M, Bramanti E, Ottaviano V, Ghiri E, Scatena F, Barsacchi R, Pompella A, Donato L, Emdin M, Paolicchi A.:** A high performance gel filtration chromatography method for gamma-glutamyltransferase fraction analysis. *Anal Biochem.* 1; 374(1):1-6. 2008.
- **Frey A, Mechelein B, Weiler-Guttler H, Mockel B, Flach R, Gassen HG.:** Pericytes of the brain microvasculature express G-glutamyl transpeptidase. *Eur J Biochem*, 202: 421 – 429, 1991.

- **Guo-Quing Han, Cheng-Yong, Rong-Hua Shu:** The analysis of g-glutamyltranspeptidase gene in different type liver tissues. *World J Gastroenterology* 9 (2): 276-280, 2003.

- **Guo-Quing Han, Cheng-Yong, Rong-Hua Shu:** The analysis of g-glutamyltranspeptidase gene in different type liver tissues. *World J Gastroenterology* 9 (2): 276-280, 2003.

- **Hanigan M.H.:** γ -Gutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. *Chemico-biological interactions* 111-112: 333-342, 1998 .

- **Hanigan M.H., Frierson HFJR:** Immunohystochemical detection of gammaglutamyltranspeptidase in normal human tissue. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 44(10): 1101-1108, 1996.

- **Hiramatsu K, Asaba Y, Takeshita S, Nimura Y, Tatsumi S, Katagiri N, Niida S, Nakajima T, Tanaka S, Ito M, Karsenty G, Ikeda K.:** Overexpression of gamma-glutamyltransferase in transgenic mice accelerates bone resorption and causes osteoporosis. *Endocrinology*. 148(6):2708-315, 2007.

- **Kazemi-Shirazi L, Endler G, Winkler S, Schickbauer T, Wagner O, Marsik C.:** Gamma glutamyltransferase and long-term survival: is it just the liver? *Clin Chem.*;53(5):940-6. 2007.

- **Paolicchi A, Minotti G, Tonarelli P.:** Gamma-glutamyltranspeptidase dependent iron reduction and LDL oxidation: A potential mechanism in atherosclerosis. *J Invest Med*, 47: 151 – 160, 1999.

- **Pompella A., Corti A., Paolicchi A., Giommarelli C., Zumino F.:** Gamma-glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance. *Curr Opin Pharmacol.* 7(4): 360-366, 2007.

- **Rutenburg A.M., Kim H., Fischbein J.W., Hanker J.S., Wassenburg H.L. Seligman A.M.:** Histochemical and ultrastructural demonstration of gamma-glutamyl transpeptidase activity. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* Vol. 17 (8):517-26, 1969.

- **Ruttmann E, Brant LJ, Concin H, Diem G, Rapp K, Ulmer H:** Gamma-glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: An epidemiological investigation in a cohort of 162, 944 Austrian adults. *Circulation*, 112: 2130– 2137, 2005.

- **Sang Heon Song, Ihm Soo Kwak, Yun Jin Kim, Seong-Jang Kim, Soo Bong Lee, Dong Won Lee, Bong Eun Lee:** Can G-Glutamyltransferase be an Additional Marker of Arterial Stiffness? *Circ. J.*, 71: 1715–1720, 2007.

- **Sang Heon Song, Ihm Soo Kwak, Yun Jin Kim, Seong-Jang Kim, Soo Bong Lee, Dong Won Lee, Bong Eun Lee:** Can G-Glutamyltransferase be an Additional Marker of Arterial Stiffness? *Circ. J.*, 71: 1715–1720, 2007.

- **Siegrist S, Laperche Y, Chobert MN, Bulle F, Nakhasi HL, Guellaen G.:** Regulation of mouse mammary-gland gamma-glutamyltranspeptidase mRNA during pregnancy, lactation and weaning. *Biochem J.* 1;267(3):621-4, 1990.

- **Vianna de Oliveira I.M., Fujimori E.:** Liver gamma-glutamyl transpeptidase activity and glutathione levels in lactating rats and pups: Effect of dietary protein quantity and feed intake. *Nutritional Biochemistry* 7: 93-98. (1996).
- **Vina J.R., Palacin M., Puertes I.R., Vina J.:** Role of the g-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation. *The American Physiological Society* 916-922, 1989.
- **Vina JR., Garcia C., Barber T.:** Regulation of amino acid metabolism during lactation. *Recent Res. Devel. Nutrition*, 4: 101-111, 2001.
- **Wannamethee G, Ebrahim S, Shaper AG.:** Gamma-glutamyltransferase: Determinants and association with mortality from ischemic heart disease and all causes. *Am J Epidemiol*, 142: 699 –708, 1995.
- **Whitfield JB.:** Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci*;38: 263-355, 2001.
- **Zhang H., Forman H.J., Choi J.:** Gamma –Glutamyl Transpeptidase in Glutathione Biosynthesis. *Methods in Enzymology* 401: 426-449, 2006.

CAPITOLO 4

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA DELLA GAMMA-GLUTAMILTRANSFERASI NEL COLOSTRO, NEL SIERO E NEL TRATTO GASTRO - INTESTINALE DI VITELLI BUFALINI NEONATI

4.1 Introduzione

Il colostro rappresenta nelle specie ruminanti la principale fonte di assunzione di anticorpi di origine materna¹⁴⁵; i vitelli bufalini nascono agammaglobulinemici, ovvero privi della protezione anticorpale conseguente a trasferimento di immunoglobuline mediato dalla placenta, pertanto, essi sono in grado di assumere tali elementi mediante ingestione di colostro. Tale evento è conosciuto come trasferimento passivo dell'immunità anticorpale; gli esiti positivi dell'assunzione di questo particolare secreto si rendono evidenti se l'ingestione avviene nel periodo neonatale¹⁴⁶. Il colostro bufalino ha un abbondante tenore di grassi e proteine, soprattutto immunoglobuline G, mentre risulta povero di lattosio, ciò a testimonianza del suo importante significato biologico.

La suzione avviene nella specie bufalina già due o tre ore dalla nascita¹⁴⁷ ed il periodo di massimo assorbimento ha una durata di circa 24 ore¹⁴⁸. Una scarsa assunzione di colostro, derivante da molteplici fattori¹⁴⁹, si traduce in livelli sierici bassi di immunoglobuline, conseguentemente molti studi sostengono che una inadeguata copertura immunitaria si renda responsabile in queste specie di numerose patologie neonatali. Anche una assunzione di colostro di scarsa qualità, ovvero a basso tenore anticorpale, riduce la copertura immunitaria. In seguito ad ingestione di colostro, il suo assorbimento avviene fondamentalmente a carico dell'intestino ed in particolare nelle prime 24 ore di vita¹⁵⁰. Alcuni Autori sostengono che l'allattamento naturale sia il metodo che assicura una corretta protezione immunitaria, mentre altri attribuiscono risultati soddisfacenti all'allattamento mediato da poppatoio, soprattutto in determinate situazioni

¹⁴⁵ Cfr: Hafez, 1984.

¹⁴⁶ Cfr: Scott et al., 1979.

¹⁴⁷ Cfr: Scott G.H. et al., 1979; Matte J.J et al., 1982.

¹⁴⁸ Cfr: Petrie L., 1984.

¹⁴⁹ Cfr: Larson R.L., 2004.

¹⁵⁰ Cfr: Hafez, 1984.

critiche¹⁵¹. È noto che circa il 25-34% di vitelli neonati non riesce ad assumere colostro immediatamente dopo la nascita, ciò induce il reperto di bassi livelli sierici di immunoglobuline in un periodo naturalmente critico¹⁵².

L'ingestione di colostro induce un incremento significativo della componente immunoglobulinica sierica¹⁵³.

Molti studi hanno inoltre indagato le relazioni intercorrenti tra il conferimento dell'immunità mediata da colostro e l'espressione di alcuni enzimi sierici¹⁵⁴. In particolare, sono stati inoltre condotti studi sul potenziale utilizzo di alcuni enzimi reperibili nel colostro, quali la Fosfatasi alcalina (ALP), la Lattico deidrogenasi (LDH) e la Gamma-glutamilttransferasi (GGT) quali *markers* di qualità del prodotto; a tal proposito, la GGT ha mostrato una attività superiore a quella dell'LDH e dell' ALP ed un più elevato indice di correlazione con le gamma-globuline di origine colostrale: questo lavoro ha dimostrato che la determinazione della gamma-glutamilttransferasi si inserisce nel panorama diagnostico quale *marker* maggiormente attendibile di qualità colostrale rispetto ad altri enzimi¹⁵⁵. Molti lavori sostengono quindi che tale l'enzima è naturalmente implicato nella determinazione delle proprietà immuni del colostro¹⁵⁶. Tale reperto ben si adatta anche ad altre specie di interesse zootecnico: uno studio effettuato sugli agnelli descrive la possibilità di utilizzazione dell'enzima gamma-glutamilttransferasi quale *marker* di trasferimento dell'immunità passiva¹⁵⁷.

Appurato il coinvolgimento dell'enzima nel trasferimento dell'immunità passiva madre/reto, le successive ricerche hanno valutato l'utilizzazione di questo enzima come *test* per la tempestiva identificazione di deficit di immunizzazione passiva nel vitello. Contestualmente, la determinazione della gamma-glutamilttransferasi è stata utile per valutare la qualità del colostro e per appurare

¹⁵¹ Cfr: Besser T.E et al.,1997; Rice D.H., 1995; Herriot D.E., 1998.

¹⁵² Cfr: Logan E.F. et al.,1974; Foster D.M., 2006, Donovan D.C., 2007.

¹⁵³ Cfr: Bogin E. et al 1993; Holloway N.,2001.

¹⁵⁴ Cfr: Maden M., 2003. Parish S.M., 1997. Perino L.J. 1993. Tessmann R.K1997.

¹⁵⁵ Cfr: Lombardi P., Avallone L. et al., 2001.; Zarrilli A., Avallone L. et al., 2003.

¹⁵⁶ Cfr: Lombardi P., Avallone L. et al.,2001.

¹⁵⁷ Cfr: Maden M. et al., 2003.

con chiarezza la responsabilità del colostro di bassa qualità nel generare una inappropriata copertura immunitaria nel giovane vitello¹⁵⁸.

L'approccio allo studio delle caratteristiche del colostro di bufala ha visto sul nascere un trasferimento delle molteplici conoscenze acquisite sul colostro vaccino in questa specie¹⁵⁹; il tentativo di adattare, quindi, queste informazioni alla specie bufalina è nato con l'obiettivo di trasferire l'uso di test idrometrici, adoperati nella valutazione della qualità del colostro vaccino, per la determinazione dell'idoneità del colostro di bufala; tuttavia questi *tests* si sono rivelati indicatori scarsamente affidabili quali di qualità del colostro nella bufala, a motivo delle importanti differenze tra due specie apparentemente molto simili. I dati avvalorano l'ipotesi che la valutazione della concentrazione sierica e colostrale della gamma-glutamilttransferasi appare maggiormente affidabile e specifica per la specie bufalina. Questo *test*, di semplice esecuzione, può essere eseguito routinariamente dall'allevatore e trovare conferma scientifica in laboratorio¹⁶⁰.

Pertanto, la determinazione della concentrazione sierica o tissutale della gamma-glutamilttransferasi, altamente legata al contenuto in IgG colostrali, risulta un indice attendibile e pratico per la valutazione di parametri di interesse zootecnico, ragion per cui l'enzima può essere usato quale:

- *Marker per l'identificazione dell'avvenuta ingestione di colostro da parte del vitello;*
- *Marker per la valutazione della qualità del colostro.*

¹⁵⁸ Cfr. Pero M.E., et al., 2001.

¹⁵⁹ Cfr. Lombardi P., Avallone L. et al., 2000.

¹⁶⁰ Cfr. Lombardi P., Avallone L., 1999; Lombardi P., Avallone L. et al., 2001.

4.2 Obiettivi della ricerca

Gli obiettivi di questo studio si propongono di rilevare relazioni intercorrenti tra la quantità di immunoglobuline presenti nel colostro di bufalo ed i corrispondenti livelli nel siero di vitelli neonati che hanno ingerito colostro immediatamente dopo la nascita.

Inoltre, questo secondo step ha il fine di individuare il ruolo dell'enzima gamma-glutamyltransferasi a livello di differenti tratti dell'apparato gastro-intestinale di vitelli bufalini neonati a differenti età ciò al fine di ipotizzare il coinvolgimento di questo sistema enzimatico nel processo di uptake dei precursori delle proteine e quindi individuare la sede deputata al massimo assorbimento della componente immunoglobulinica di origine materna.

In questo ambito, si è inserito il progetto di formazione di una banca di colostro di alta qualità per uso zootecnico.

4.3 Materiali e Metodi

4.3.1 Misure sperimentali

Per affrontare il secondo step del lavoro sperimentale, sono stati inclusi nel protocollo di ricerca 10 vitelli bufalini, cui è stato somministrato colostro e latte per 14 giorni e 12 vitelli bufalini maschi cui è stato somministrato colostro fino a 168 ore di vita. Gli animali erano nati nel periodo compreso tra gennaio e marzo 2005. Le madri erano state allevate per tutto il periodo della gravidanza nelle stesse condizioni di stabulazione, alimentazione e non avevano subito alcun trattamento terapeutico.

4.3.2 Raccolta dei campioni

Campioni ematici effettuati mediante prelievo giugulare sono stati ottenuti dai 10 vitelli bufalini prima e 1, 3, 5, 9 e 14 giorni dopo ingestione di colostro. Inoltre, il colostro è stato prelevato successivamente alla nascita ed 1 e 3 giorni dopo. I campioni di colostro sono stati centrifugati a 20.000 g per 30 minuti, lo strato intermedio è stato prelevato per le analisi.

Gli altri 12 vitelli bufalini sono stati sacrificati e da questi sono stati prelevati campioni provenienti da abomaso, duodeno, digiuno, ileo, cieco, colon e retto. Tutti i vitelli erano stati preventivamente sottoposti ad un accurato esame clinico con il fine di escludere eventuali patologie, con particolare attenzione alle affezioni del tratto gastro-intestinale. I campioni tissutali sono stati accuratamente stoccati e conservati in azoto liquido. Essi sono stati assegnati a tre gruppi sperimentali:

- *Gruppo 1:* vitelli di età compresa tra le 6 e 36 ore di vita;
- *Gruppo 2:* vitelli di età compresa tra le 37 e 168 ore di vita.

4.3.3 Determinazioni sieriche e colostrali dell'attività enzimatica della gamma-glutamyltransferasi

Sono state effettuate determinazioni sieriche dell'enzima gamma-glutamyltransferasi, delle proteine totali, dell'albumina e delle frazioni globuliniche. La metodologia applicata per la determinazione del contenuto proteico sia sierico che colostrale ha seguito il protocollo dettato dal metodo biuretico¹⁶¹, per l'albumina invece sono state effettuate determinazioni colorimetriche. Per ottenere la concentrazione delle globulina è stata effettuata una sottrazione della frazione alluminica dal totale delle proteine. Per la registrazione dell'attività cinetica della gamma-glutamyltransferasi è stato adoperato un apparecchio "Reflotron". Per la determinazione delle frazioni proteiche sono state effettuate separazioni elettroforetiche.

4.3.4 Determinazione dell'attività enzimatica tissutale della gamma-glutamyltransferasi

Appena dopo il prelievo, ogni sezione del tratto gastro-intestinale dei vitelli bufalini neonati è stata lavata con soluzione fisiologica. Il tessuto, ridotto in frammenti minuti, è stato sottoposto ad omogeneizzazione con *Janche e Kunchel IKA-WERK ultra turrax* (1 gr / 4 ml PBS). Gli omogenati sono stati successivamente centrifugati a 3000 Xg per quindici minuti; il surnatante è stato utilizzato per le analisi.

Per la valutazione della concentrazione dell'enzima negli omogenati di tessuto, è stato utilizzato TRIS buffer pH 8.25 100mmol/L addizionato con glicilglicina 100 mmol/L a cui veniva aggiunto il campione e L-g-glutamyl-3-carboxi-p-nitroanilide in qualità di attivatore della reazione. Per la lettura dei campioni è stato utilizzato uno spettrofotometro Perkin Elmer. La densità ottica (OD) è stata

¹⁶¹ Cfr.: Gornall A.G et al., 1949.

letta alla lunghezza d'onda di 405 nm. I risultati sono stati espressi U/gr di tessuto.

4.3.5 Localizzazione dell'attività enzimatica tissutale della gamma-glutamyltransferasi

Tutti i campioni del tratto gastro-intestinale dei vitelli bufalini neonati sono stati congelati per immersione in azoto liquido (-170 °C) immediatamente dopo il prelievo. Le sezioni (4-8 micron), ottenute al criostato, sono state adagiate su vetrini pretrattati con silano, essiccate all'aria e poi incubate a 25 °C secondo protocollo¹⁶².

Dopo 30 minuti di incubazione del campione a temperatura ambiente, le sezioni lavate con soluzione salina sono state trasferite in una soluzione di solfato cuprico a 0.1 M per 2 minuti. Dopo lavaggio in soluzione salina ed in acqua distillata, le sezioni sono state essiccate e montate in PBS- glicerolo¹⁶³. Infine sulle sezioni è stata effettuata una colorazione di contrasto con ematossilina al fine di evidenziare i nuclei.

4.3.5 Estrazione dell'RNA, disegno dei primer e reazione di RT-PCR

Tutti i campioni tissutali, accuratamente conservati ed aliquotati, sono stati sottoposti ad una estrazione dell'RNA utilizzando TRIZOL¹⁶⁴. Dopodichè è stato

¹⁶² Protocollo: soluzione preparata a fresco :

1. gamma-glutamyl-metossi-2-naftilamide (GMNA);
2. (2.5 gr/ml), tris buffer (0.1 M), pH 7.4;
3. soluzione salina (0.85%);
4. glicilglicina;
5. blu forte (diazotized 4'-amino-2',5'-diethoxybenznilide), (BBN).

¹⁶³ Cfr: Rutenburg A. R. e al., 1968.

¹⁶⁴ Sigma Saint Louis, Missouri, USA.

effettuato il disegno dei primer partendo dalla sequenza relativa all'uomo pubblicata su "gene bank" e riportata di seguito :

DEFINITION Homo sapiens gamma-glutamyltransferase 1 (GGT1), transcript variant 3, mRNA

```
1 gcctggattc tcccagagat tgcctggaac accagctcgg gtccctgcac accatcctgc
61 ggggtgcagcc caaaactgtc ttctgaggaa gaggtgtctt cctgggcccc cactgtcccc
121 aggcctcagc aaggcaagtg aggtgtgcc gtcacccagg ctggacagtt cagtatttg
181 cctgagggcc cacagcagag ttcaactgga gacagagaaa ccagctagag acagagggag
241 gtaacacgga gtccccaga aaggtctggg ctgcgcgtgc ttcaggtaac ctcccttgac
301 cttcaggaga acgagaaggc tgcctgatca gagagtccct gaagaagatt ctgtggctac
361 aggcttcagc agagtgtgag ggagaccccg gttatttctt cagctatttc caccaaatcc
421 tctgtcttt cgtggccaac accccaggca aggcttgggg cccctgtctg ctgctggacg
481 cagagccatg aagaagaagt tagtggtgct gggcctgctg gccgtgggtc tgggtgctgt
541 cattgtcggc ctctgtctt ggctgccctc agcctccaag gaacctgaca accatgtgta
601 caccagggct gccgtggccg cggatgccaa gcagtgtctg aagattggga gggatgcact
661 gcgggacggt ggctctgcgg tggatgcagc cattgcagcc ctgttgtgtg tggggctcat
721 gaatgcccac agcatgggca tcgggggtgg cctcttctc accatctaca acagacccac
781 acgaaaagct gaggtcatca acgcccgcga ggtggccccc aggctggcct ttgccacct
841 gttaacacgc tcggagcagt cccagaaggg ggggctgtcg gtggcggtgc ctggggagat
901 ccgaggctat gagctggcac accagcggca tgggcggctg ccctgggctc gcctcttcca
961 gccagcacc cagctggccc gccagggctt cccctggggc aagggttgg cggcagccct
1021 ggaaaacaag cggaccgtca tcgagcagca gcctgtcttg tgtgaggtgt tctgccggga
1081 tagaaagggt cttcgggagg gggagagact gaccctgccg cagctggctg acacctacga
1141 gacgctggcc atcgagggtg cccaggcctt ctacaacggc agcctcacgg cccagattgt
1201 gaaggacatc caggcggccg ggggcattgt gacagctgag gacctgaaca actaccgtgc
1261 tgagctgacg gagcaccgcg tgaacatcag cctgggagac gcggtgtgtg acatgccagc
1321 tgcgccgctc agcgggcccc tcttgccct catctcaac atctcaaaag ggtacaactt
1381 ctccggggag agcgtggaga gccccagca gaagggcctg acgtaccacc gcatcgtaga
1441 ggctttccgg ttgcctacg ccaagaggac cctgcttggg gaccccaagt ttgtggatgt
1501 gactgaggtg gtccgcaaca tgacctccga gttcttcgt gccagctcc gggccagat
```

1561 *ctctgacgac accactcacc cgatctccta ctacaagccc gagttctaca cgccggatga*
 1621 *cgggggcact gctcacctgt ctgtcgtcgc agaggacggc agtctgtgt cgcaccacag*
 1681 *caccatcaac ctctactttg gctccaaggt ccgctccccg gtcagcggga tcctgttcaa*
 1741 *taatgaaatg gacgacttca gctctcccag catcaccaac gagtttgggg tacccccctc*
 1801 *acctgccaat tcatccagc caggggaagca gccgctctcg tccatgtgcc cgacgatcat*
 1861 *ggtggggccag gacggccagg tccggatggt ggtgggagct gctgggggca cacagatcac*
 1921 *cacggccact gcactggcca tcatctacaa cctctggttc ggctatgacg tgaagcgggc*
 1981 *cgtggaggag ccccggtgc acaaccagct tctgccaac gtcacgacag tggagagaaa*
 2041 *cattgaccag gcagtgactg cagccctgga gaccggcac catcacacc agatcgcgtc*
 2101 *caccttcac gctgtggtgc aagccatcgt ccgcacggct ggtggctggg cagctgcctc*
 2161 *ggactccagg aaaggcgggg agcctgccgg ctactgagtg ctccaggagg acaaggctga*
 2221 *caagcaatcc agggacaaga tactcaccag gaccaggaag gggactctgg gggaccggct*
 2281 *tccctgtga gcagcagagc agcacaataa atgaggccac tgtgcc*

Inoltre la sequenza umana è stata allineata con altre note in “*gene bank*” al fine di individuare i tratti conservati tra le diverse specie. Più precisamente, la sequenza umana è stata allineata con quella del ratto (*rattus norvegicus*) e del topo (*mus musculus*).

I primer disegnati nel tratto C-terminale della sequenza umana sono stati riportati di seguito:

Disegno dei primer e reazione RT-PCR-Primer:

for C 5' - TTG TGA CAG CTG AGG ACC TG - 3' rev. C - 5'- CCC TTT GAG GAT GTT GAG GA - 3';

for B 5'- CCA GCA CCA TCA ACC TCT AC - 3' revB 5'- TGG ATG AAA TTG GCA GGT GAG - 3'.

Condizioni PCR: 94° C, 30”; 50° C, 20”; 72° C, 1'. (35 cicli).

Il disegno dei *primer* è stato effettuato con programma Primer Express 3.0 software¹⁶⁵. I *primer* per l'amplificazione del gene GGT sono stati disegnati sulla sequenza specifica della specie bufalina pubblicata in gene bank¹⁶⁶, mentre come gene di riferimento o *housekeeping* è stato usato il GADPH bovino (AY 974798).

¹⁶⁵ *Applied Biosystems.*

¹⁶⁶ *Cfr: Pero M.E., Avallone L. et al., 2006.*

Per verificare l'efficienza della retro-trascrizione (RT) ed escludere contaminazioni da DNA, un frammento di cDNA di β -actina (NC 007326) è stato amplificato con dei *primer* disegnati su un tratto di sequenza contenente un introne. I prodotti di PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5%. La *Real time* è stata utilizzata per valutare le differenze quantitative del recettore calcio nei diversi tratti dell'apparato gastro-intestinale a varie età. È stata analizzata l'espressione dell'mRNA del recettore¹⁶⁷ e le condizioni di *Real time* sono state le seguenti:

Condizioni RT-PCR: 2 min a 50° C, 10 min a 95° C, 40 cicli di denaturazione a 95° C per 15 s e annealing/estensione a 60° C per 1 min.

I pozzetti con un volume finale di 25 μ l contenevano 1 μ l di cDNA (40ng). Inoltre sono stati effettuati tre replicati per ciascun campione e per il controllo endogeno. I dati sono stati elaborati mediante il metodo comparativo¹⁶⁸. Per le analisi statistiche è stato utilizzato lo Student's T-test.

4.3.6 Elaborazione statistica dei dati

Tutti i risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (M \pm SD). Le differenze all'interno del gruppo sono state calcolate tramite one-way ANOVA¹⁶⁹. Ogni test è stato eseguito in duplicato e la media dei risultati è stata utilizzata per il calcolo. Le differenze sono state considerate significative per $P < 0.01$.

¹⁶⁷ ABI PRISM 7400 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

¹⁶⁸ Cfr: Livak e Schmittgen, 2001.

¹⁶⁹ SAS Institute Inc.

4.4. Risultati

4.1 Determinazioni sieriche e colostrali della gamma-glutamyltransferasi

Riporteremo di seguito i risultati relativi prima alla determinazione dei livelli sierici dei parametri di interesse, successivamente, per comparare tali dati, ai rilievi effettuati su colostro.

I livelli sierici della gammaglutamyltransferasi rilevati nel periodo antecedente l'ingestione di colostro sono risultati pari a 35.4 ± 19.1 U/l. Successivamente all'ingestione di colostro è stato notato un incremento significativo di tale parametro, in particolare nel primo giorno post-partum (1563 U/l). Nei giorni successivi è stata apprezzata una graduale riduzione dei livelli enzimatici, fino alla determinazione del valore più basso ottenuto in quattordicesima giornata post-partum (48 ± 41). Inoltre, è stato determinato un incremento del 50% delle proteine totali sieriche nel primo giorno successivo l'ingestione di colostro, con un conseguente lento decremento del loro valore nel corso della prima settimana. Non sono state apprezzate modifiche significative di livelli delle albumine e α -globuline nell'intero periodo della sperimentazione. Sono stati osservate variazioni lievi dei livelli di β -globuline, prima e dopo ingestione colostrale (6.3 ± 0.1 vs $7.5 - 8.2$ g/l). il reperto maggiormente significativo è stato riscontrato a carico delle γ -globuline: si evince un considerevole incremento dei valori di questo parametro prima e dopo la poppata (4.2 ± 0.5 vs 32.9 ± 1.2 g/l in prima giornata), successivamente è stato registrato un lento decremento di tali valori (17.5 ± 0.6 g/l). analogamente è stato riscontrato un significativo aumento delle globulina totali prima e dopo ingestione colostrale (17.9 vs 46.2 g/l) ed una riduzione al 14° giorno (31.9 g/l). parallelamente, i valori riscontrati per il rapporto albumine/globuline (A/G) hanno mostrato livelli minori nel primo giorno seguente il parto rispetto al 14° (0.46 ± 0.28 vs 0.9 ± 0.2).

Il tenore in proteine del colostro dopo il parto risulta molto elevato (125.5 ± 10.2 g/l), ma la concentrazione subisce un decremento del 20% già al terzo giorno post-partum (20.3 ± 2.85 g/l). sono stati registrati decrementi significativi dell'enzima gamma-glutamilttransferasi (circa il 90%), delle α -globuline (circa il 70%), e delle γ -globuline (94%). È stato apprezzato un analogo andamento circa il rapporto albumine/globuline (0.26 ± 0.04 vs 1.04 ± 0.12).

Infine, sono stati determinati i coefficienti delle correlazioni tra gamma-glutamilttransferasi sierica e proteine sieriche: correlazioni significative sono state apprezzate tra l'enzima e le globuline fino al terzo giorno post-partum, con un decremento della significatività nei giorni successivi (Tabella 3).

Comparando la distribuzione elettroforetica delle proteine sieriche dei vitelli prima e dopo la poppata e le stesse nel colostro, è stato notato un incremento delle γ -globuline nei soggetti che avevano assunto colostro, inoltre, un incremento delle stesse fino a valori del 54.2% rispetto alle altre frazioni proteiche del colostro (Tabella 4).

Analita	Campionamento in giorni					
	Prima	1	3	5	9	14
GGT	35 ± 19	1563 ± 1283	380 ± 406	142 ± 149	95 ± 94	48 ± 41
PT	50.1 ± 9	74.9 ± 14.1	69.1 ± 11	65.2 ± 8.2	58.4 ± 17	61.2 ± 8.1
Albumina	32.3 ± 0.4	28.7 ± 1.1	27.9 ± 0.6	28 ± 0.6	25.9 ± 0.6	29.3 ± 0.3
Globuline	17.9 ± 1.7	46.2 ± 4.4	$12. \pm 1.5$	35.7 ± 3.3	32.5 ± 3.7	31.9 ± 2.9
Alfa-globuline	7.3 ± 0.1	5.8 ± 0.3	7.1 ± 0.3	6.6 ± 0.1	6.9 ± 0.3	7.8 ± 0.1
Beta- globuline	6.3 ± 0.1	7.5 ± 0.4	7.9 ± 0.3	8.2 ± 0.3	7.1 ± 0.3	7.8 ± 0.2
Gamma- globuline	4.2 ± 0.5	32.9 ± 1.2	25.9 ± 0.9	20.9 ± 0.8	15 ± 1.1	17.5 ± 0.6
Albumina/Globuline	1.9 ± 0.4	0.46 ± 0.28	0.53 ± 0.32	0.8 ± 0.2	0.80 ± 0.3	0.9 ± 0.2

Tabella 3: Livelli sierici di gamma-glutamilttransferasi e proteine in vitelli bufalini a differenti giorni prima e dopo ingestione di colostro.

<i>Analita</i>	<i>Campionamento in giorni</i>		
	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>3</i>
<i>GGT</i>	<i>16621±2999</i>	<i>7903±1605</i>	<i>1714±338</i>
<i>PT</i>	<i>125.5±10.2</i>	<i>39.6±3.3</i>	<i>20.3 ±2.5</i>
<i>Albumina</i>	<i>26.2± 0.2</i>	<i>19.9±0.1</i>	<i>10.3± 0.1</i>
<i>Globuline</i>	<i>99.1±5.2</i>	<i>19.4±2.9</i>	<i>10±1.6</i>
<i>Alfa-globuline</i>	<i>22.4±0.2</i>	<i>6.7±0.1</i>	<i>2.9±0.1</i>
<i>Beta- globuline</i>	<i>5±0.1</i>	<i>3.3±0.1</i>	<i>4.6±0.1</i>
<i>Gamma- globuline</i>	<i>71.7±0.4</i>	<i>9.4±0.1</i>	<i>15±1.1</i>
<i>Albumina/Globuline</i>	<i>0.26±0.04</i>	<i>1.03±0.17</i>	<i>1.04 ±0.12</i>

Tabella 4: Concentrazione della gammaglutamiltransferasi e delle proteine colostrali a differenti tempi dopo la nascita

4.2 Determinazione dell'attività enzimatica tissutale della gamma-glutamyltransferasi

La cinetica enzimatica della gamma-glutamyltransferasi è stata registrata per tutti i tratti dell'apparato digerente sottoposti a sperimentazione (*Abomaso, Duodeno, Digiuno, Ileo, Cieco, Colon, Retto*) ed in entrambi i gruppi di animali (*Gruppo 1 e Gruppo 2*), (*Figura 6*). Tutti i tratti summenzionati ed entrambi i gruppi sottoposti a sperimentazione esprimono la presenza di attività enzimatica da parte della gamma-glutamyltransferasi.

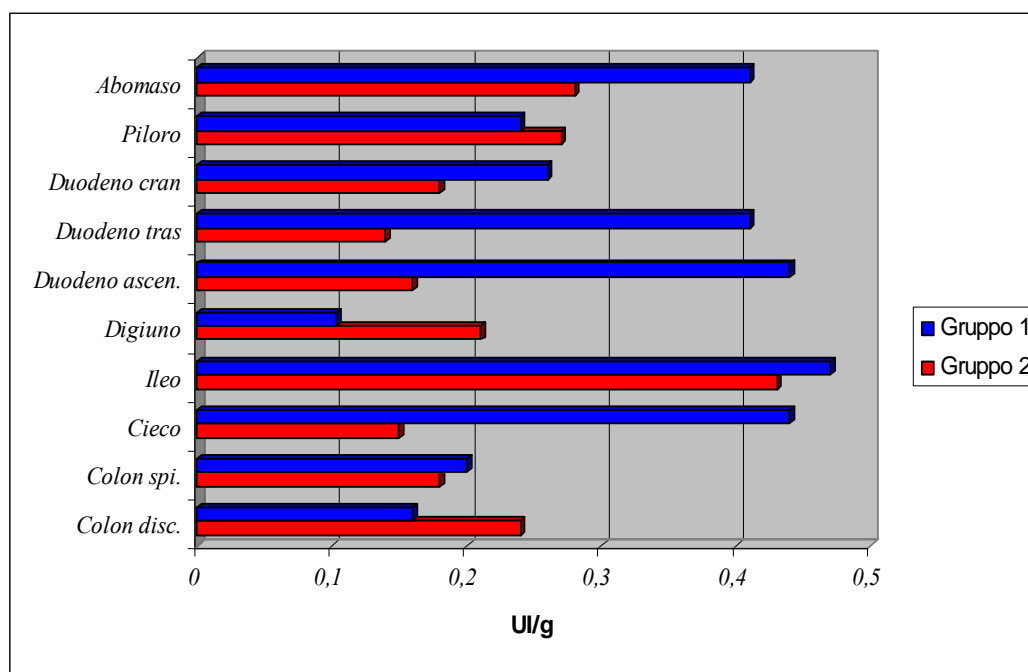


Figura 6: attività della gamma-glutamyltransferasi nei vari segmenti intestinali nei gruppi sottoposti a sperimentazione.

Tuttavia, è stato appurato dall'indagine un importante incremento dell'attività dell'enzima nel gruppo dei vitelli di età compresa tra le 6 e le 36 ore (*Gruppo 1*). La maggiore concentrazione dell'espressione enzimatica della gamma-

glutamyltransferasi presente nel *Gruppo 1* si manifesta in tutti i tratti dell'apparato digerente esaminato se confrontati con quelli dei vitelli di età compresa tra le 37 e le 168 ore di vita (*Gruppo 2*). Inoltre, è stato apprezzato un ulteriore dato significativo che mette in luce una maggiore espressione dell'enzima nel duodeno, digiuno ed ileo rispetto agli altri segmenti intestinali esaminati; ciò risulta apprezzabile, sebbene con maggior chiarezza nel *Gruppo 1*, in tutti gli animali sottoposti a sperimentazione.

4.3 Localizzazione tissutale della gamma-glutamyltransferasi

La reazione di Istochimica, anche in questo caso, conferma il dato biochimico ottenuto dall'analisi enzimatica degli omogenati di tessuto e consente la determinazione della localizzazione della gamma-glutamyltransferasi a livello di enterocita. Le immagini che seguono evidenziano l'espressione tissutale della GGT nei vari tratti dell'apparato digerente di vitello bufalino sottoposti ad indagine sperimentale (*Abomaso, Duodeno, Digiuno, Ileo, Cieco, Colon*). Esse evidenziano sia la differenza di espressione dell'attività stessa tra i due gruppi di vitelli (*Gruppo 1* – *Gruppo 2*) che il sito di produzione dell'enzima. La reazione d'Istochimica che verrà letta di seguito su tutte le sezioni si presenta con una colorazione rosso mattone e con formazioni granulose fini e diffuse localizzate nel citoplasma degli enterociti.

ABOMASO: l'attività della gamma-glutamyltransferasi risulta simile tra i vitelli neonati di 6 - 36 ore (*Gruppo 1*) e quelli di 37 – 168 ore (*Gruppo 2*); tuttavia, confrontando le sezioni di entrambi i gruppi (sezioni a reazione positiva), con il controllo negativo, si è evidenziata un'assenza significativa dell'espressione dell'enzima in questo gruppo di animali. Da questo studio si evince che la gamma-glutamyltransferasi si localizza preferenzialmente a livello di epitelio abomasale (*Figura 7-8*).

Seguono una serie di immagini di preparati di vari tratti dell'apparato digerente di vitelli bufalini neonati.

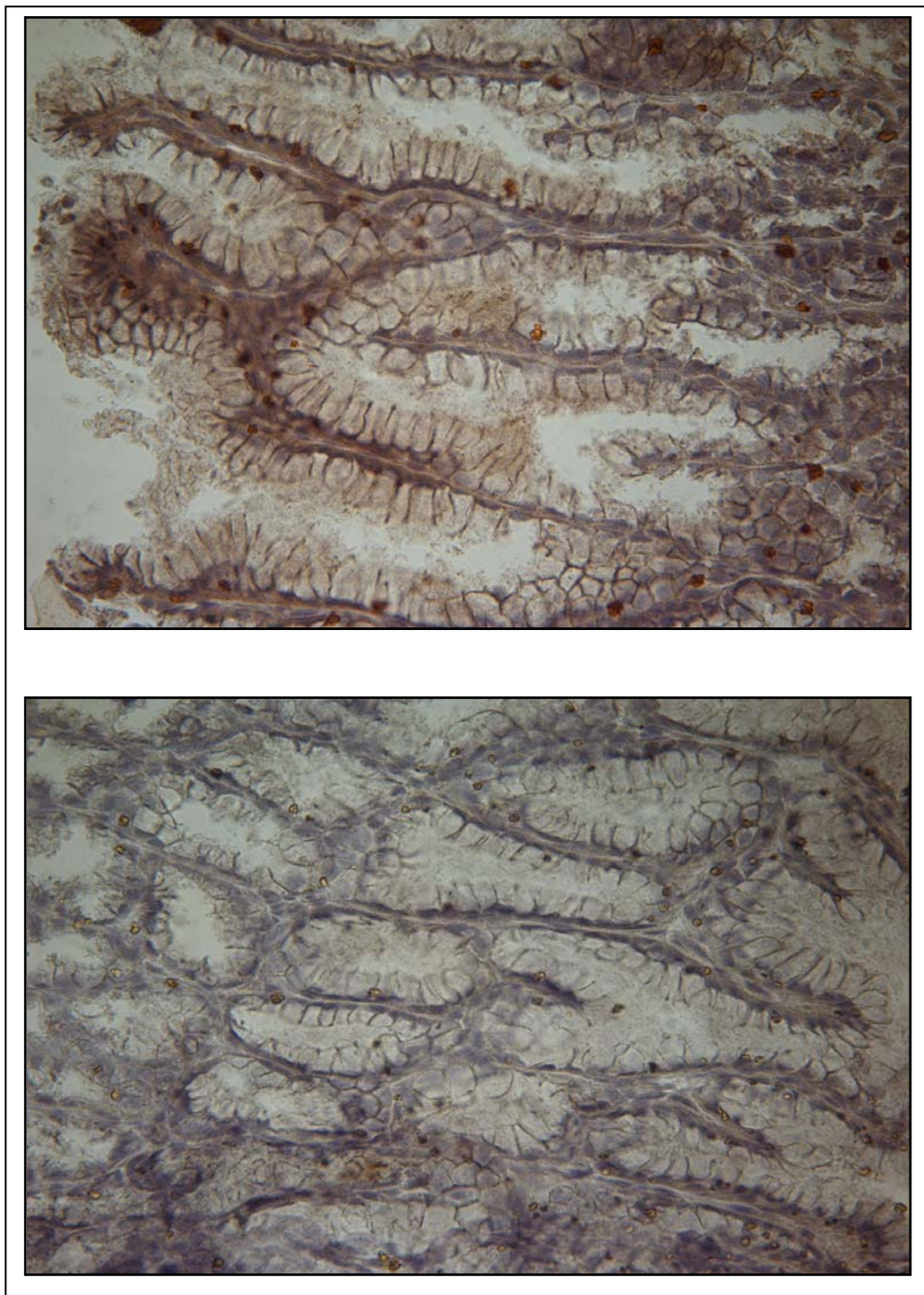


Figura 7: espressione della gamma-glutamyltransferasi nell'abomaso (Gruppo 1 e Controllo negativo rispettivamente)

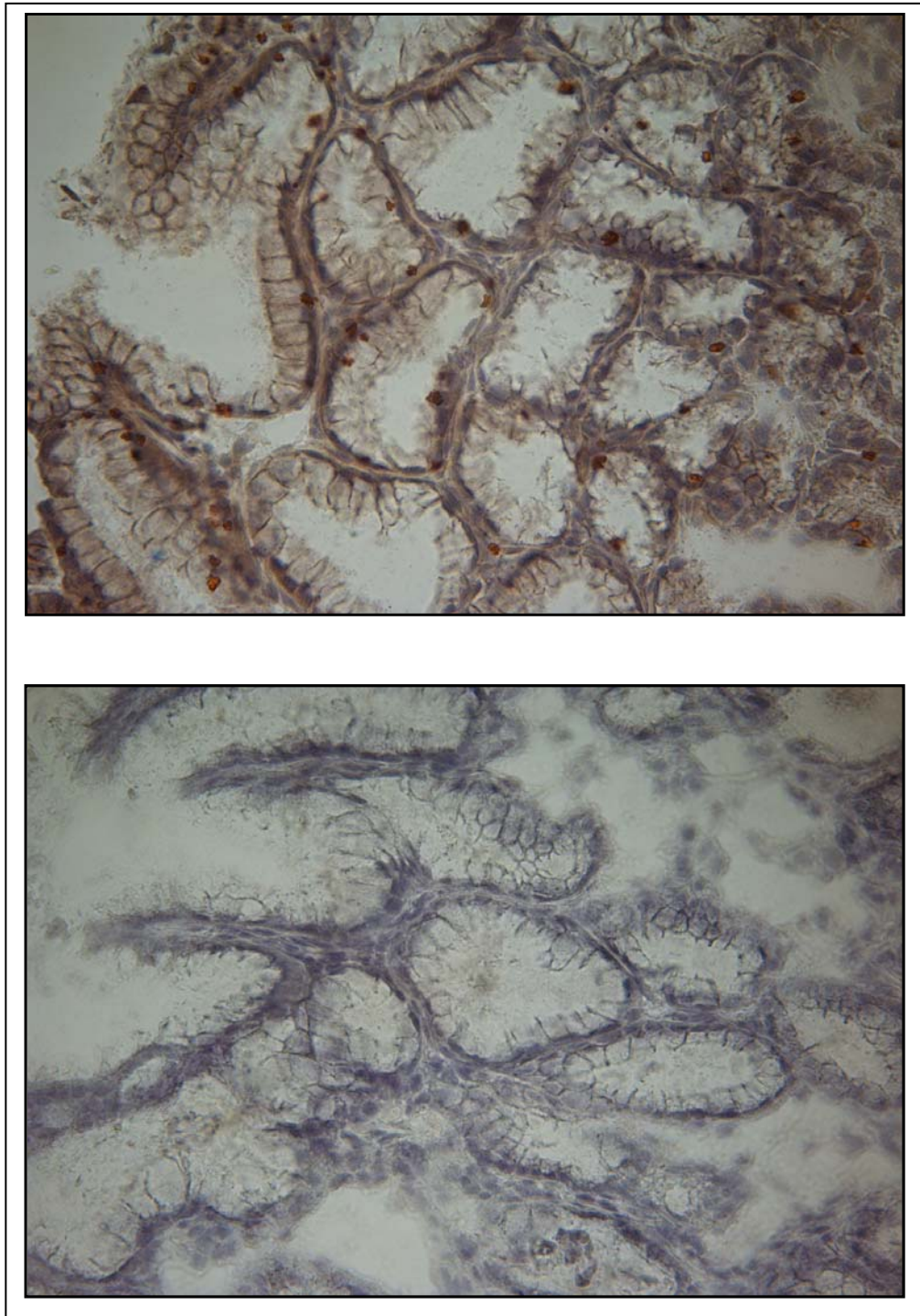


Figura 8: espressione della gamma-glutamyltransferasi nell'abomaso (Gruppo 2 e Controllo negativo rispettivamente).

DUODENO: il tratto duodenale è stato suddiviso in tre sezioni: *duodeno craniale*, *duodeno discendente*, *duodeno ascendente*. L'attività della gamma-glutamilttransferasi è stata evidenziata in tutti i tratti del duodeno, con una localizzazione elettiva a carico dei villi intestinali.

- *Duodeno craniale*: l'attività della gamma-glutamilttransferasi è espressa soprattutto a livello delle ghiandole di Lieberkuhn mentre sembra essere appena “*faint*” verso l'apice dei villi intestinali nei soggetti neonati (*Gruppo 1*), (*Figura 9-10*). Lo stesso aspetto si può evidenziare ad una settimana di vita (*Gruppo 2*), dove l'attività della GGT, ridotta a livello delle cripte ghiandolari, tende a spostarsi verso la base dei villi. Questo concetto sembra più chiaro osservando l'immagine di una sezione di tessuto a minore ingrandimento (10X) dove si possono osservare le differenze di attività dell'enzima a livello delle cripte ghiandolari e dei villi, in questi ultimi appare nettamente la presenza di un'attività appena accennata dell'enzima. Ad ogni modo le sezioni osservate evidenziano un'attività più intensa a 6 ore di vita (*Gruppo 1*) rispetto alle 168 ore di vita (*Gruppo 2*), (*Figura 11*).

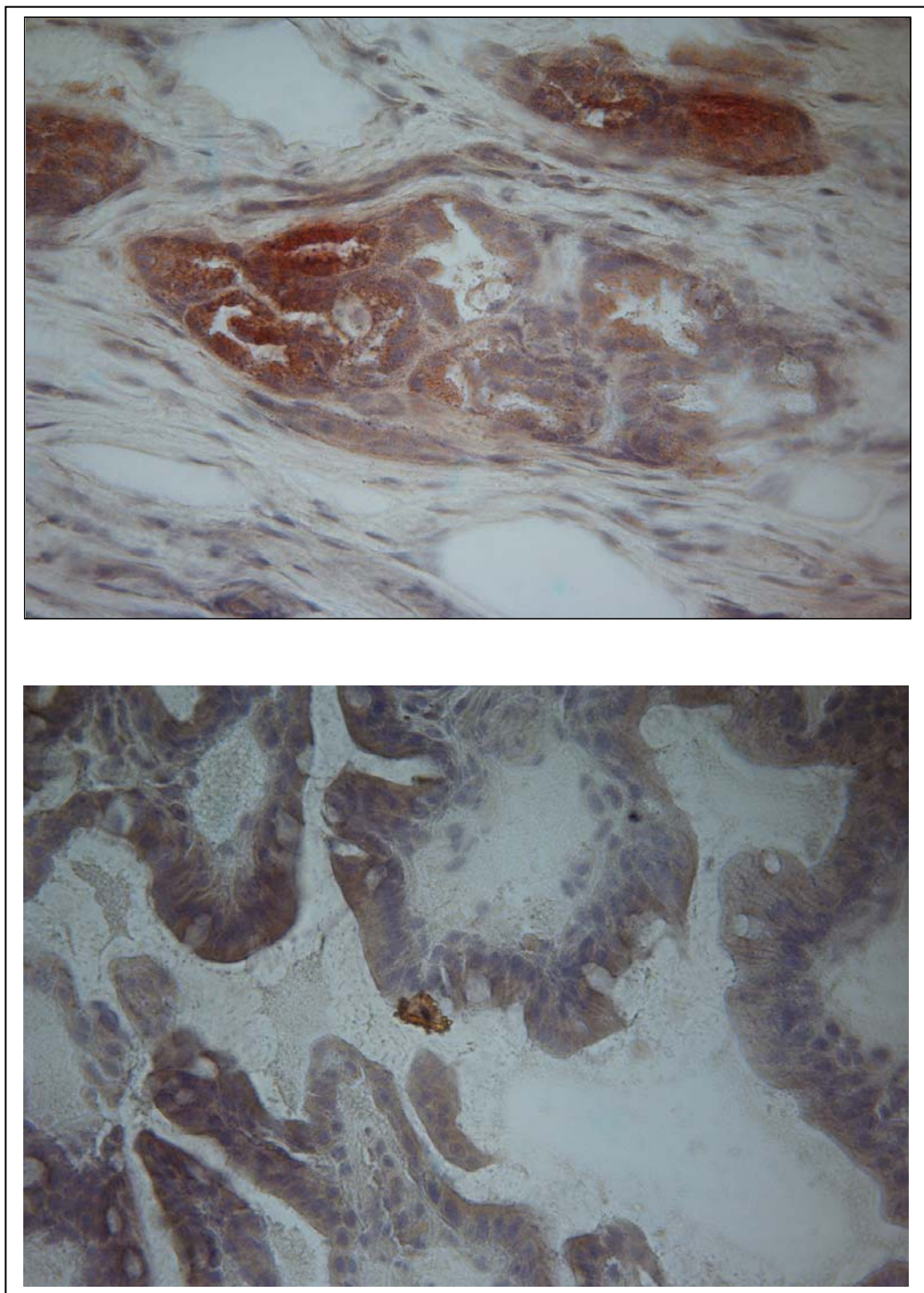


Figura 9: espressione della gamma-glutamyltransferasi nel duodeno craniale (Gruppo 1 e Controllo negativo rispettivamente).

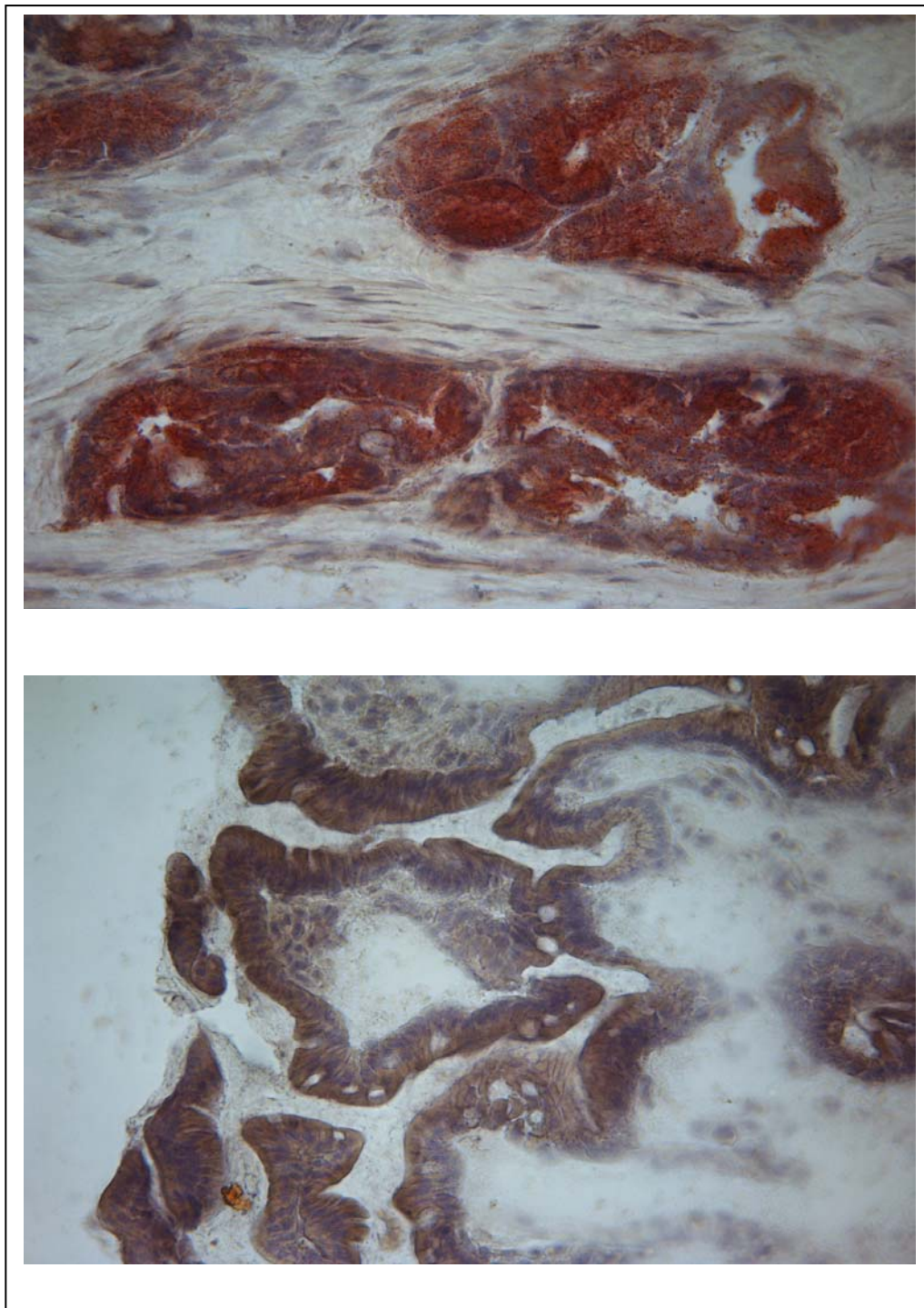


Figura 10: espressione della gamma-glutamyltransferasi nel duodeno craniale nel Gruppo 1 (Particolare delle Gh. del Lieberkhun sopra a ingrandimento 40x e ingrandimento 10x sotto)).

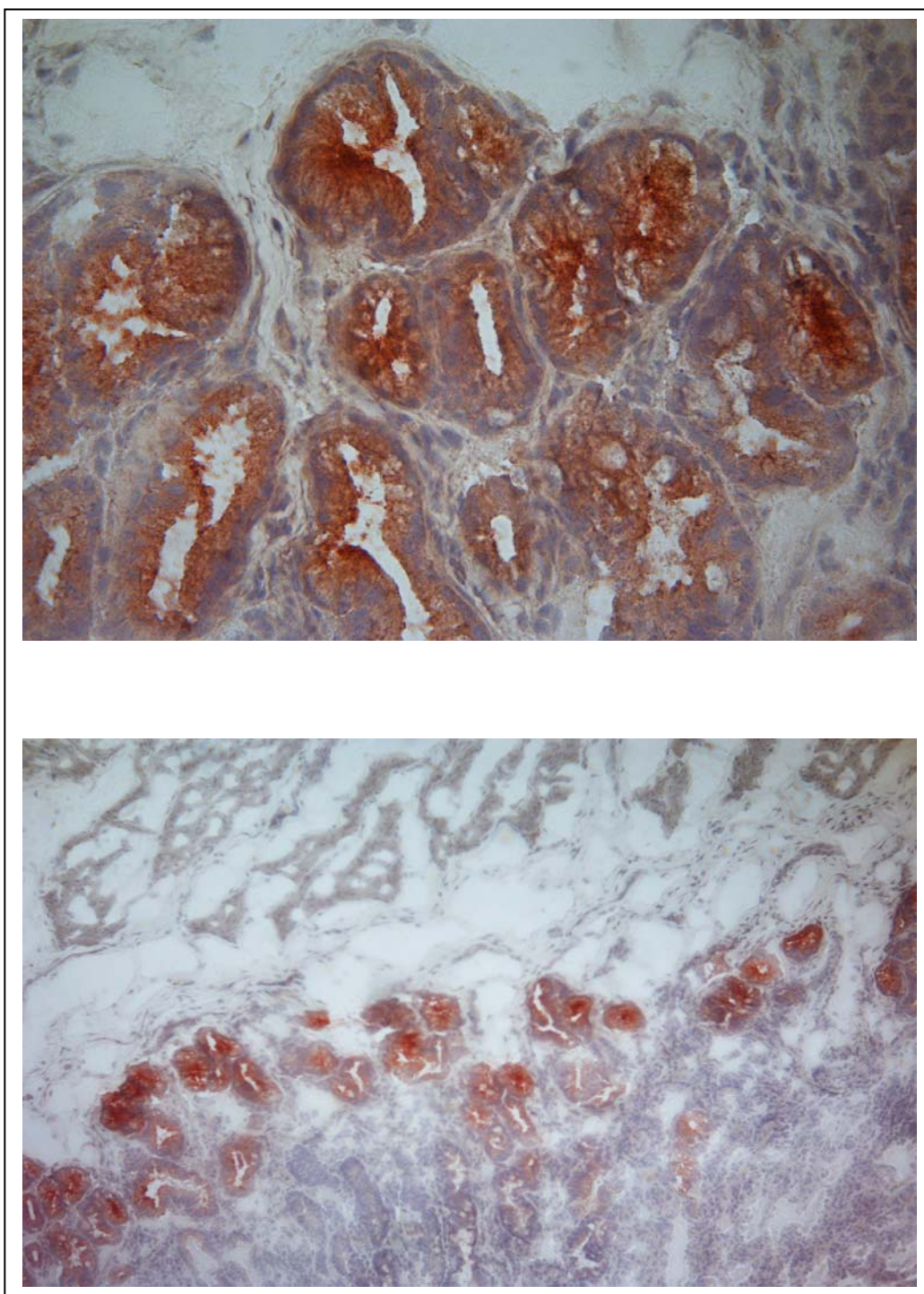


Figura 11: espressione della gamma-glutamyltransferasi nel duodeno craniale nel Gruppo 2 (a ingrandimento 40x sopra e ingrandimento 10x sotto).

- *Duodeno discendente*: in questi preparati è possibile notare una sostanziale differenza con il tratto intestinale precedentemente esaminato. In questa porzione anatomica, l'attività dell'enzima si sposta dalle cripte ghiandolari, localizzate nella sottomucosa del tratto craniale, all'epitelio del villo intestinale. A 6 ore di vita (*Gruppo 1*) l'attività della GGT risulta più intensa e si localizza a livello dell'epitelio dei villi intestinali. All'osservazione dell'intera sezione di intestino è stato possibile constatare che l'epitelio presenta delle zone ad intensa attività che si alternano a zone con minore attività. Questo reperto dimostra che l'attività enzimatica in questo tratto appare chiaramente disomogenea. Una ulteriore importante osservazione permette di affermare che l'intensità dell'attività della gamma-glutamilttransferasi tende a ridursi notevolmente nel secondo gruppo di vitelli a partire dalle 40 ore di vita per poi scomparire quasi del tutto a 168 ore di vita (*Figura 12*).
- *Duodeno ascendente*: l'andamento della reazione enzimatica cambia in maniera decisiva con il progredire del tempo e con "l'invecchiamento" del vitello; pertanto, si evidenzia un'intensa attività della gamma-glutamilttransferasi a 6 ore di vita (*Gruppo 1*) e la completa assenza della stessa a 168 ore (*Gruppo 2*). Peraltro, le differenze riscontrate tra l'attività a 168 ore di vita (*Gruppo 2*) e il controllo negativo sembrano quasi nulle. Questi reperti indicano che ad una settimana di vita in questo tratto intestinale l'enzima è completamente assente (*Figura 13-14*).

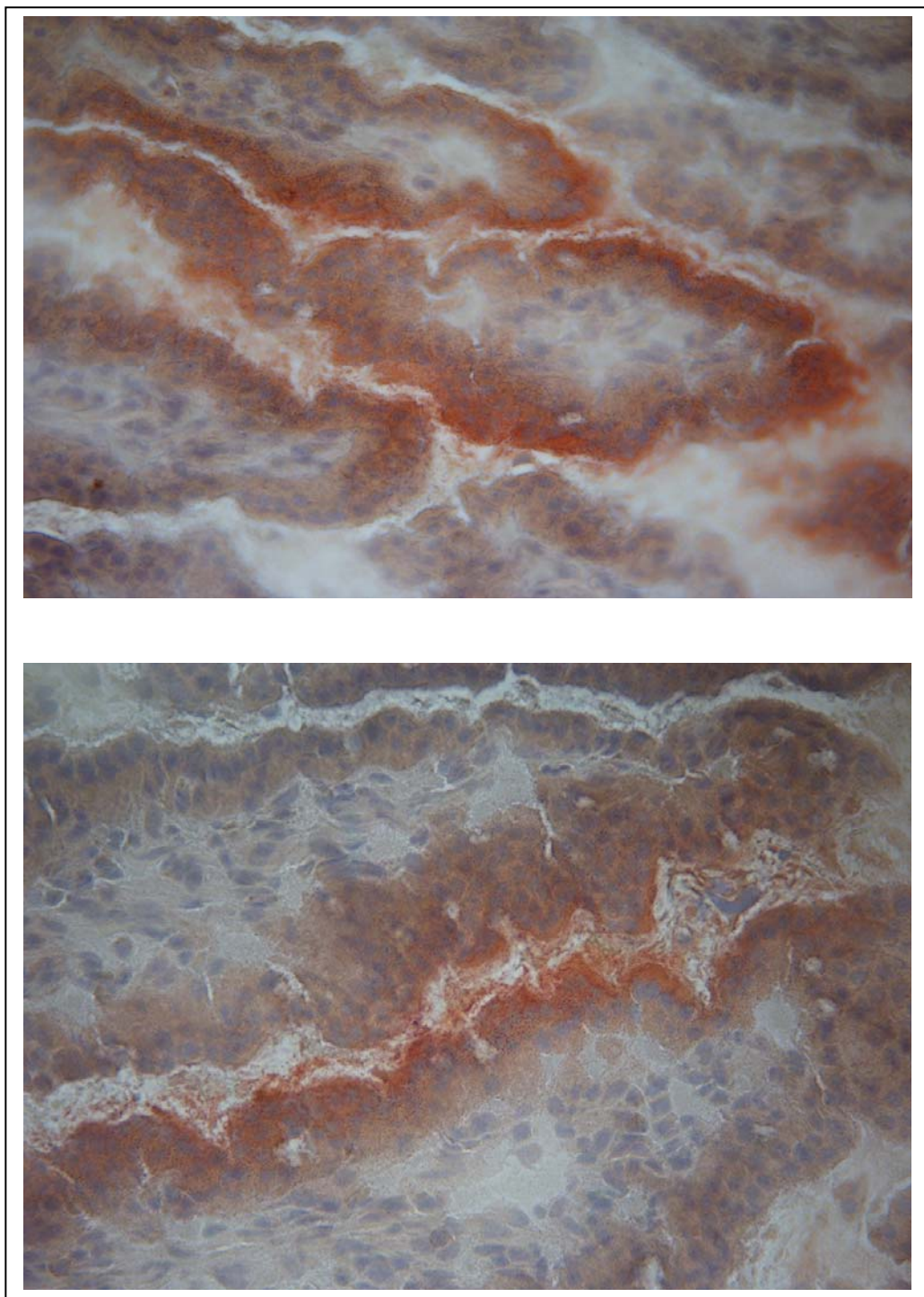


Figura 12: espressione della gamma-glutamyltransferasi nel duodeno discendente nel Gruppo 1 (sopra) e nel Gruppo 2 (sotto).

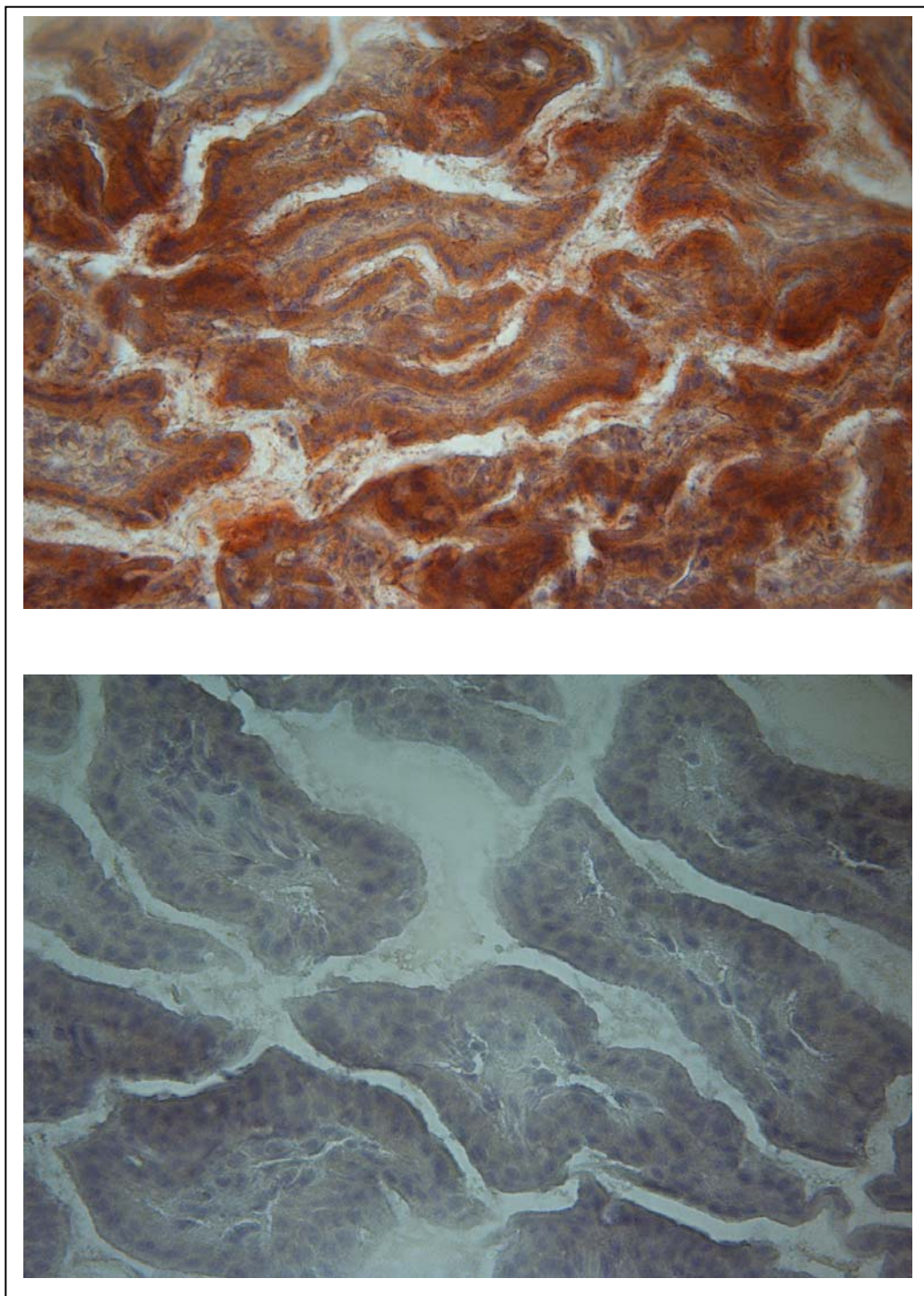


Figura 13: espressione della gamma-glutamyltransferasi nel duodeno ascendente nel Gruppo 1 (sopra) e nel Controllo negativo (sotto).

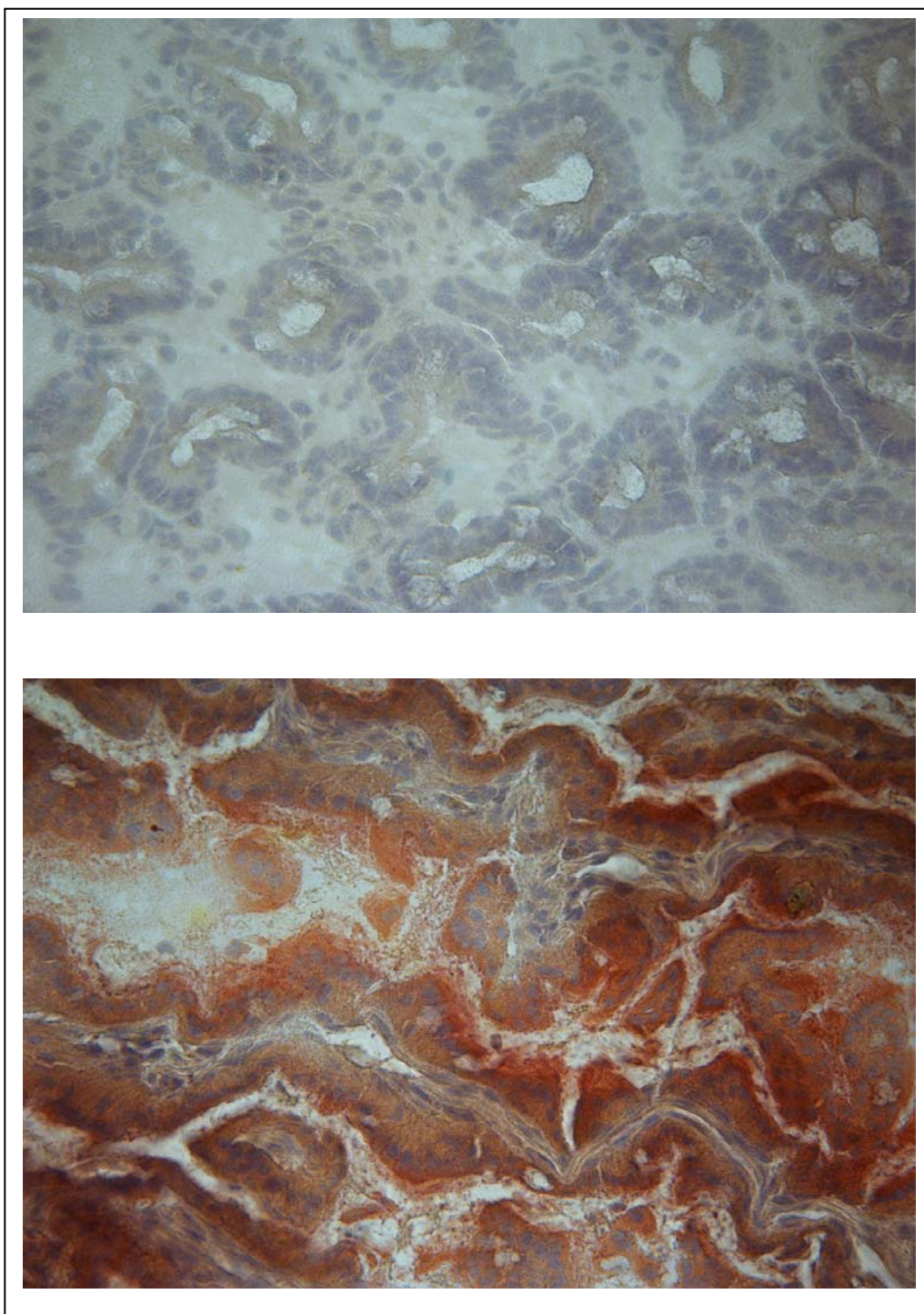


Figura 14: espressione della gamma-glutamyltransferasi nel duodeno ascendente nel Gruppo 2(sopra) e nel Gruppo 1 (sotto).

DIGIUNO: l'attività della gamma-glutamyltransferasi si presenta particolarmente intensa a 6 ore vita (*Gruppo 1*) e si esprime in maniera omogenea su tutta la lunghezza del villo intestinale. In questo tratto, le differenze tra i due gruppi sono più marcate e, a 168 ore di vita, la reazione è quasi completamente assente. Queste differenze sono maggiormente evidenti mettendo a confronto le sezioni a reazione positiva (*Gruppo 1 – Gruppo 2*) con i controlli negativi, (*Figura 15-16*).

ILEO: l'attività della gamma-glutamyltransferasi è ben evidente all'apice dei villi intestinali in entrambi i gruppi di vitelli sottoposti a sperimentazione (*Gruppo 1 – Gruppo 2*). Un importante reperto presente sulla totalità dei preparati mostra che la reazione enzimatica si riduce notevolmente a 168 ore di vita, per poi scomparire negli animali di oltre una settimana di vita (*Figura 17*).

CIECO: nei preparati è stata nettamente evidenziata una localizzazione della gamma-glutamyltransferasi a livello dell'apice dei villi. Peraltro, la reazione appare estremamente ridotta rispetto alle sezioni dei tratti dell'apparato digerente precedentemente presi in esame. Tra i due gruppi (*Gruppo 1 – Gruppo 2*) non si evidenziano differenze sostanziali nell'intensità dell'espressione dell'enzima (*Figura 18*).

COLON: in questi preparati si possono notare simili reperti rispetto al tratto intestinale precedentemente esaminato. Nel colon, l'attività enzimatica espressa a livello dell'epitelio dei villi intestinali si riduce notevolmente e le differenze con il segmento intestinale antecedente sono appena accennate. Questo dato dimostra con chiarezza la netta riduzione dell'attività dell'enzima gamma-glutamyltransferasi nel tratto terminale dell'intestino (*Figura 19*).

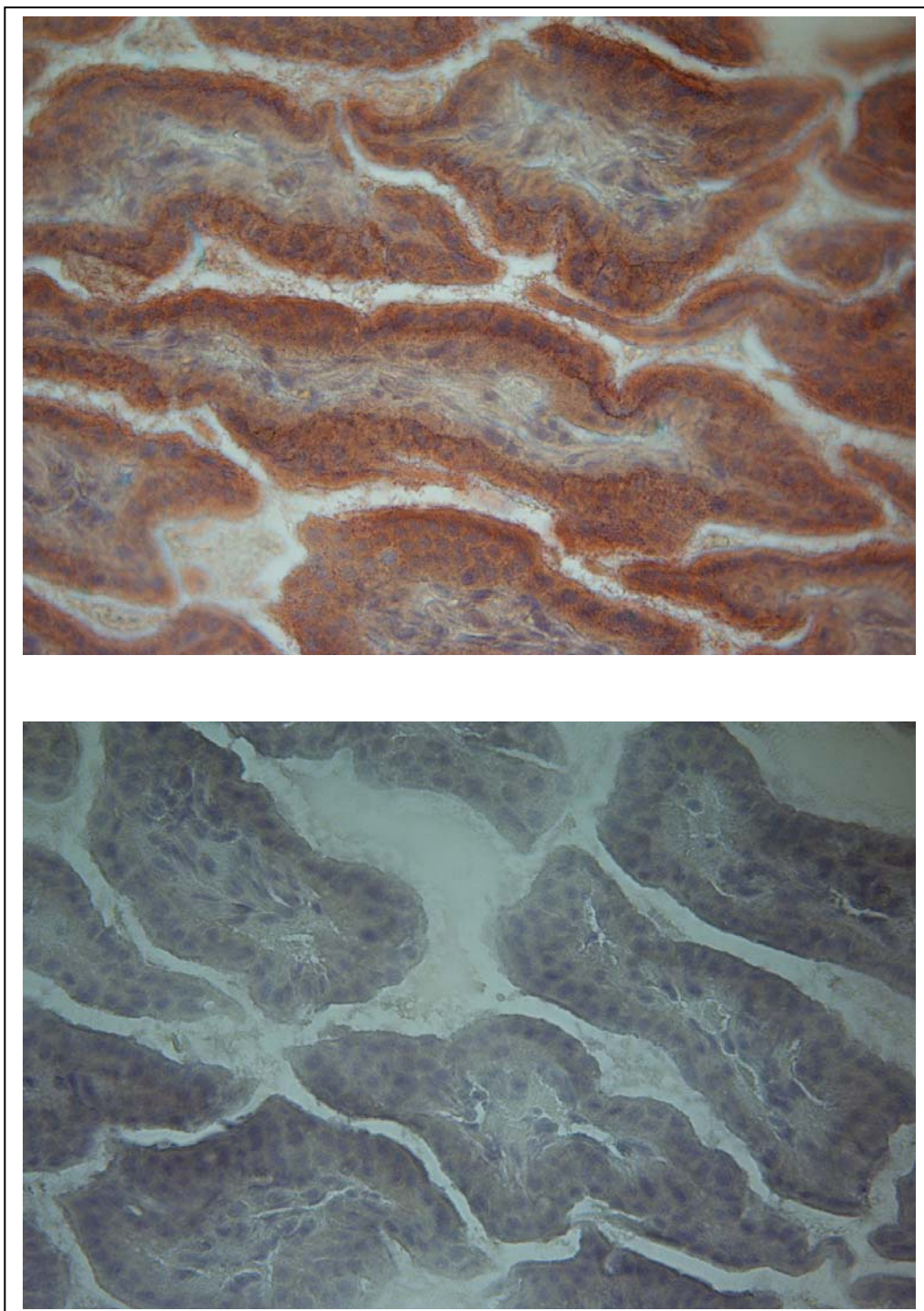


Figura 15: espressione della gamma-glutamyltransferasi nel digiuno nel Gruppo 1(sopra) e nel Controllo negativo (sotto).

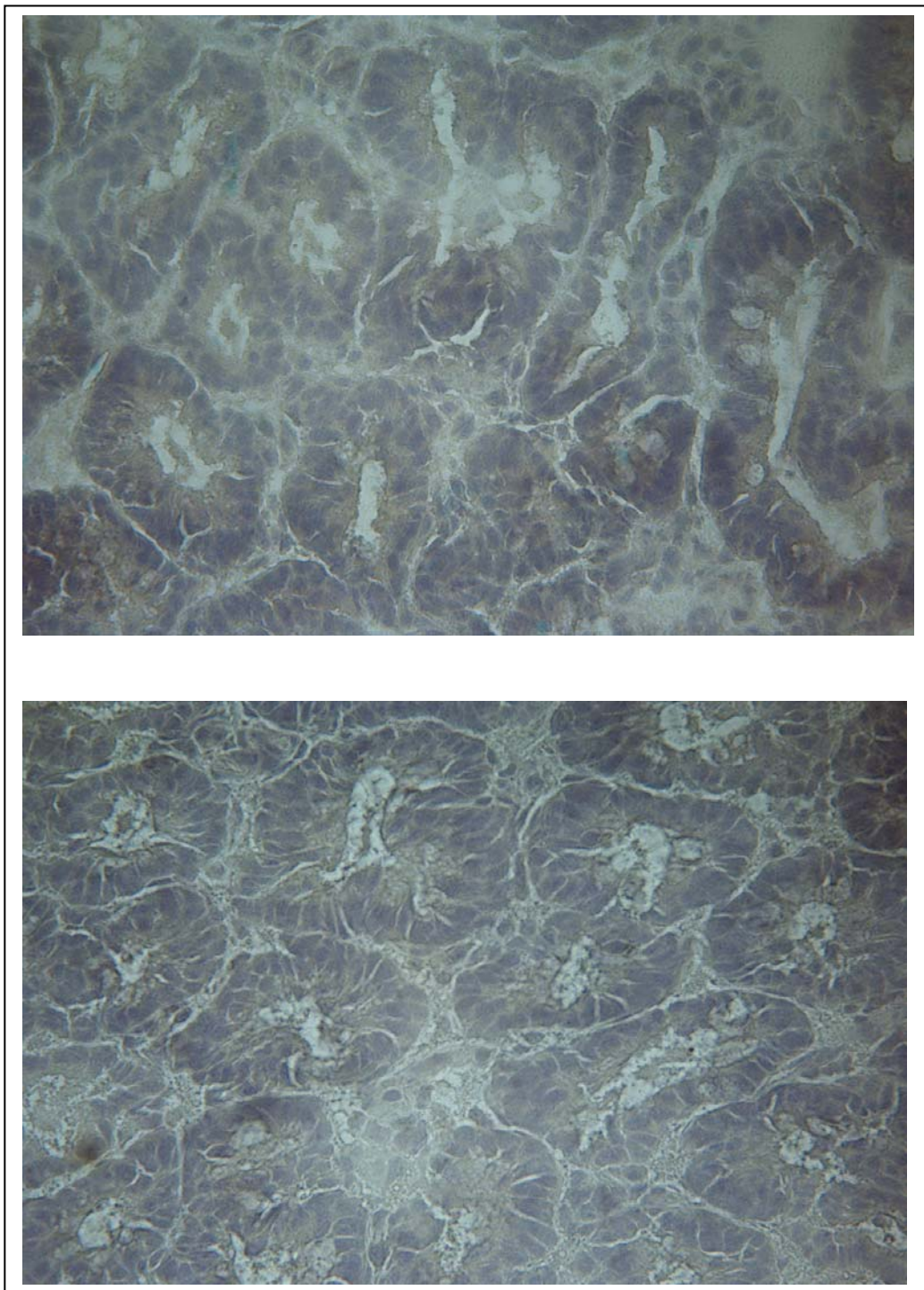


Figura 16: espressione della gamma-glutamilttransferasi nel digiuno nel Gruppo 2 (sopra) e nel Controllo negativo (sotto).

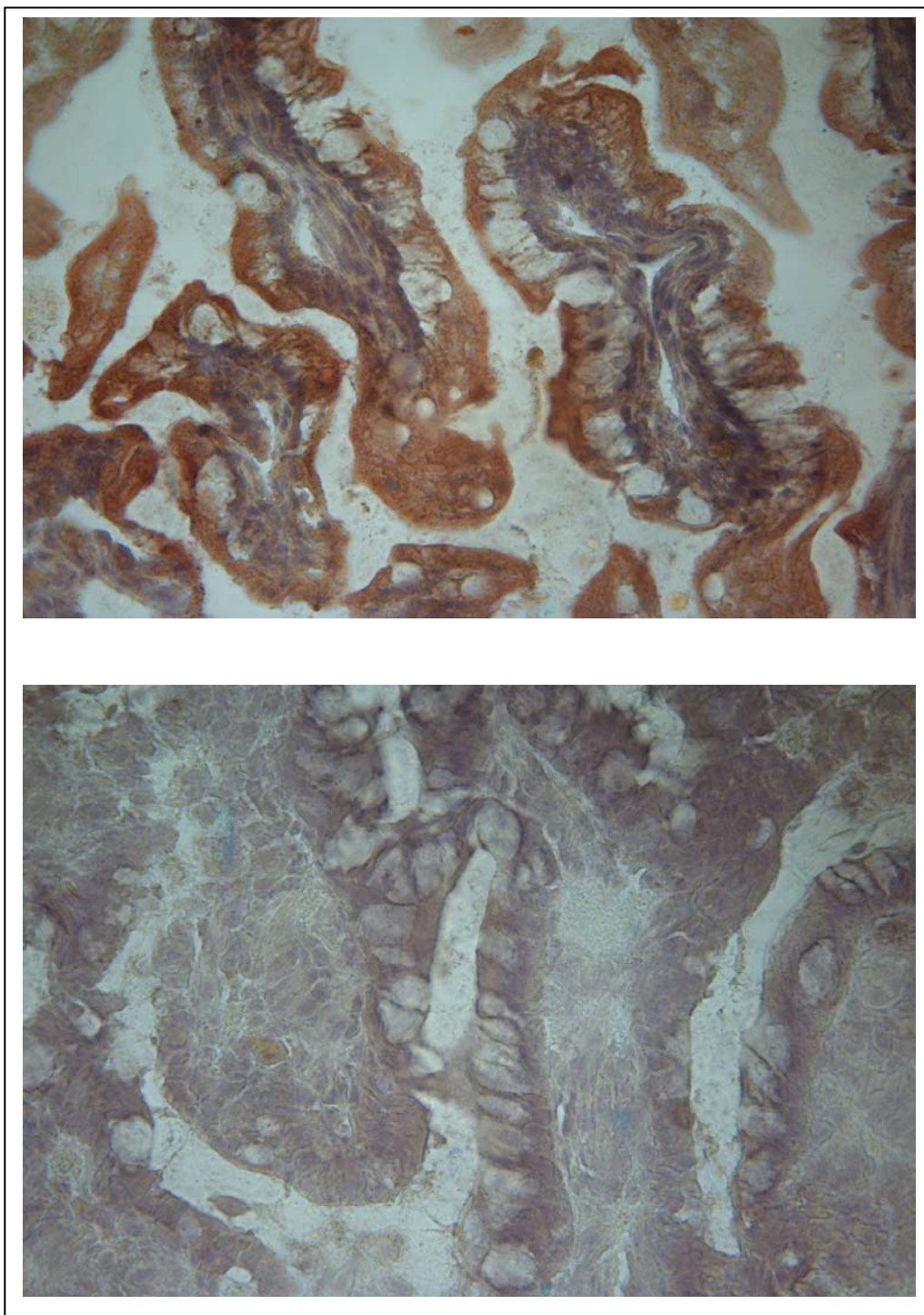


Figura 17: espressione della gamma-glutamyltransferasi nell'ileo nel Gruppo 1(sopra) e nel Gruppo 2 (sotto).

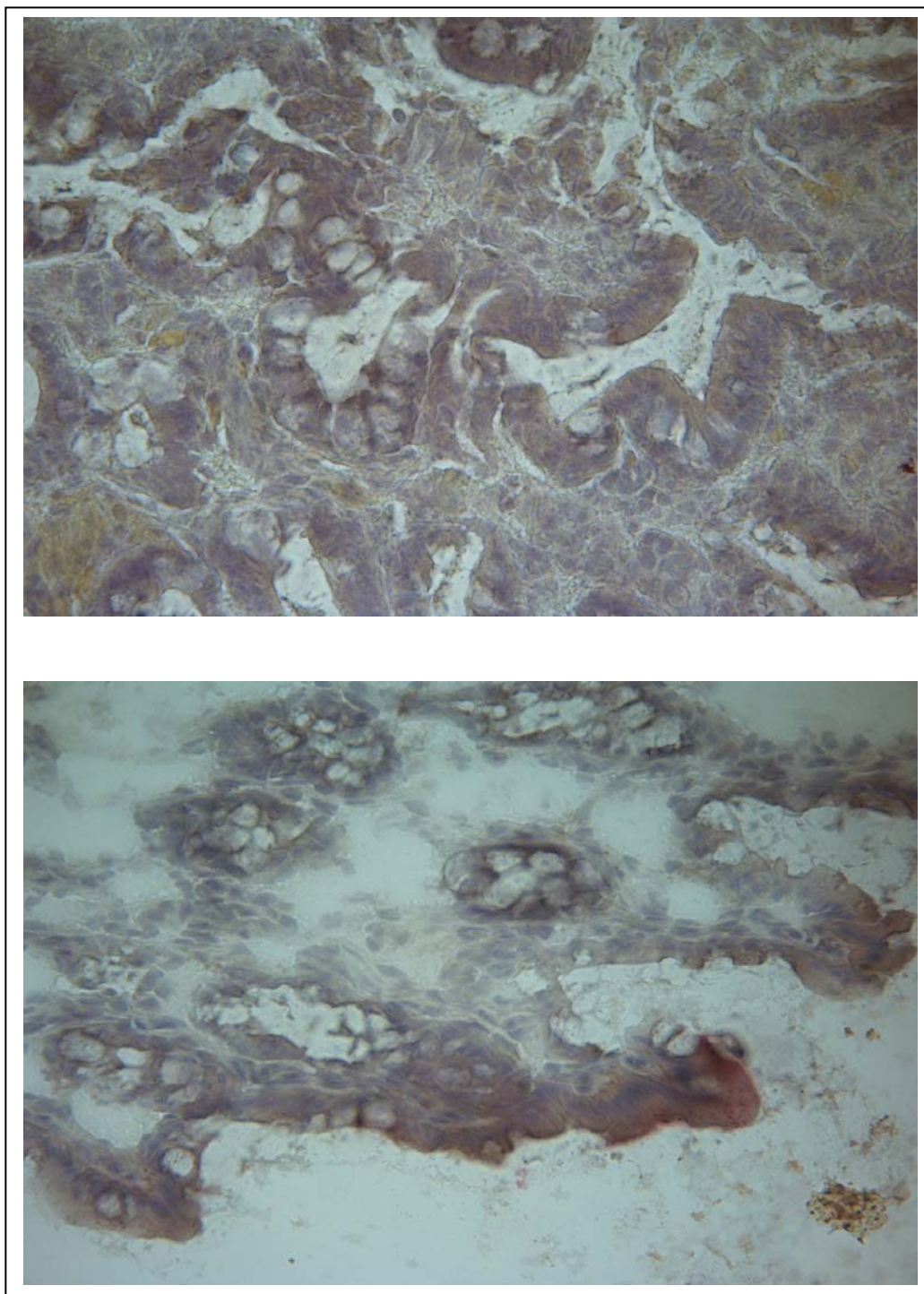


Figura 18: espressione della gamma-glutamyltransferasi nel cieco nel Gruppo 1(sopra) e nel Gruppo 2 (sotto).

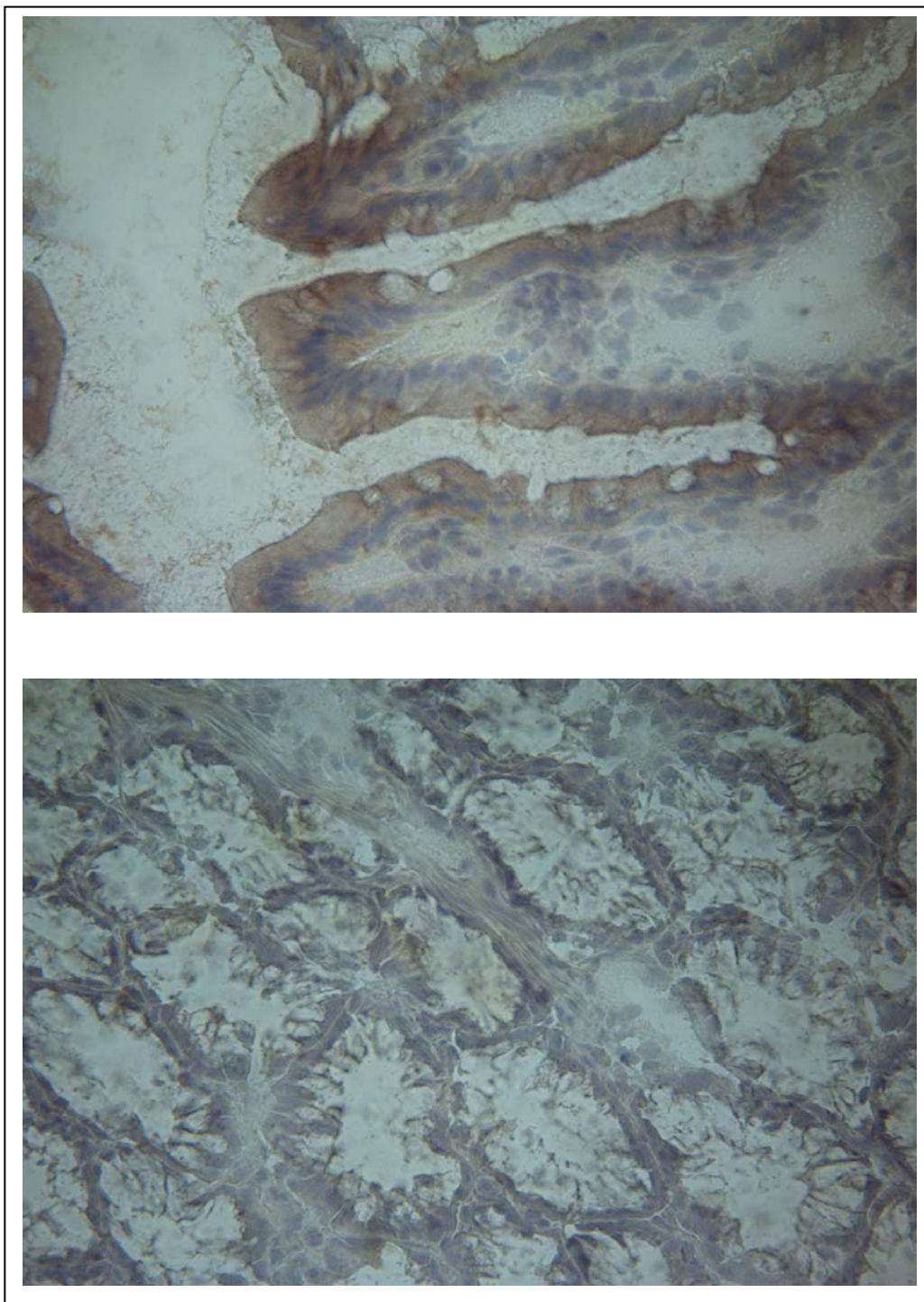


Figura 19: espressione della gamma-glutamyltransferasi nel colon nel Gruppo 1(sopra) e nel Gruppo 2 (sotto).

4.4 Real Time – PCR

Con la reazione di RT-PCR si proceduti all'amplificazione di un tratto di 440 bp del gene che codifica per la gamma-glutamyltransferasi tipo 1 (GGT1) in condizioni fisiologiche. Per ottenere l'analisi qualitativa del mRNA dell'enzima è stato necessario sequenziare un tratto specifico del gene GGT della specie bufalina. Pertanto, è stato necessario partire dal disegno dei *primer* della sequenza umana pubblicata su “*gene bank*”, per poi sequenziare inizialmente due tratti contigui da 140bp localizzati nel tratto C terminale della sequenza stessa. I tratti precedentemente menzionati, specifici per la specie bufalina *Bubalus Bubalis*, presentavano una omologia di specie del 94% con *Homo Sapiens*, del 92% con *Canis Familiaris* e dell'88% con *Sus scrofa* (Figura 20).

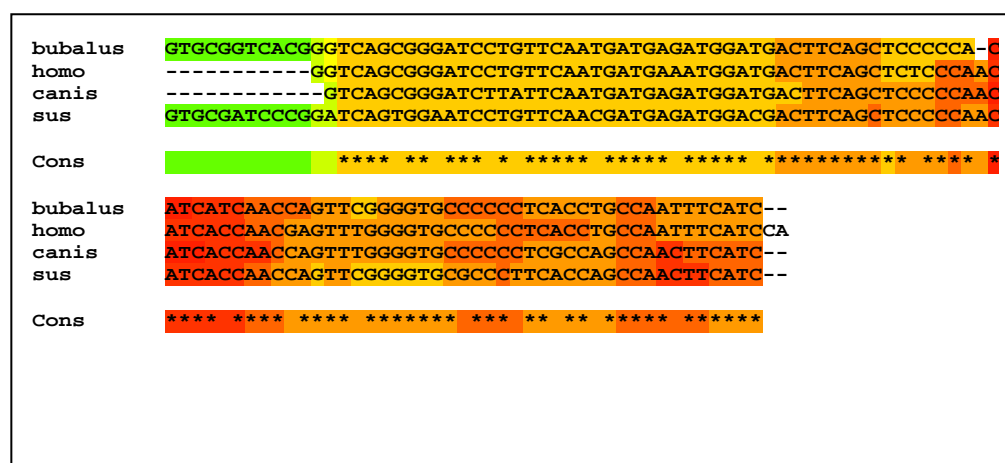


Figura 20: Sequenziamento nel Gruppo 1 di un frammento intestinale

Pur avendo ottenuto due tratti contigui da 140bp circa è stato necessario ottenere una sequenza più lunga per rendere il risultato più specifico. Di conseguenza, nella stessa zona C terminale della sequenza umana, considerando l'andamento delle basi azotate della sequenza già ottenuta, sono stati disegnati altri *primer* che ci hanno permesso di ottenere un frammento di 440bp con la stessa omologia tra le specie. Questo tratto è stato sequenziato e pubblicato su “*gene bank*” con i seguenti parametri identificativi (Figura 21):

Codice di accesso: AM60200.

NCBI Nucleotide

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books

Search Nucleotide for Go

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display GenBank Show 5 Send to

Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: Refresh

LOCUS AM260200 573 bp mRNA linear MAM 21-APR-2006

DEFINITION Bubalus bubalis partial mRNA for gamma-glutamyl transferase (ggt gene).

ACCESSION AM260200

VERSION AM260200.1 GI:93204714

KEYWORDS gamma-glutamyl transferase; ggt gene.

SOURCE Bubalus bubalis (water buffalo)

ORGANISM [Bubalus bubalis](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Bovinae; Bubalus.

REFERENCE 1
AUTHORS Pero,M. and De Luca,A.
TITLE Bubalus bubalis gamma-glutamyl transferase mRNA, partial cds
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 573)
AUTHORS Pero,M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-APR-2006) Pero M., Structure, Function and Biol. Technologies, University of Naples Federico II, via Veterinaria, 1, 80137 Napoli, ITALY

FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..573
/organism="Bubalus bubalis"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:89462"
/tissue_type="liver"
/country="Italy:Campania"
[gene](#) <1..573
/gene="ggt"
[CDS](#) <1..468
/gene="ggt"
/codon_start=1
/product="gamma-glutamyl transferase"
/protein_id="[CAJ91093.1](#)"
/db_xref="GI:93204715"
/translation="SYRAELVEQPLSISLGDAQLYAPSAPLSGPVIALILNILKGNF
SRASVETPEQKGLTYHRIVEAFRFAYAKRTLGLDPKFVNVTEVVRNMTSEFFAAQLRA
RISDSTTHPASYYEPEFYTPDGGGTAHLSVVSSEDGSAVSATSTINLYFGSKVR"

ORIGIN
1 agctaccggg cagagctggt tgagcagccg ctgagcatca gcctcgggga cgcccagctc
61 tacgcgcccc gtgccccgct cagcgggccc gtgctggccc tcatcctcaa catcctcaaa
121 gggaacaact tctcccgggc gacgctggag acgctgagc agaagggcct gacctaccac
181 cgcacgtggt aggccttcct cttgcctac gccaagagga cctgcttggt ggacccaag
241 ttgtcaacg tgactgaggt ggtccggaac atgacctcgc agttccttgc cgcccagctc
301 cgggcccggg tctccgacag caccactcac ccagcctcct actacgagcc tgagttctac
361 acgcccagac gcgggggtac cgcccacctg tcggtggtct cggaggacgg aagcgctgtg
421 tcagccacca gcaccatcaa cctctacttc ggttccaagg tcggtgacg ggtcagcgcc
481 atcgtgttca atgatgagat ggatgacttc agctccccc acatcatcaa ccaattcggg
541 gtgccccct cactcgccaa ttctatcgct cca

Figura 21: dati pubblicati su "gene banck".

I risultati dell'indagine di RT-PCR dimostrano che l'attività riscontrata nel tratto gastro-intestinale di vitello bufalino neonato mediante le precedenti indagini di Analisi Biochimica e Reazione Istochimica non rappresentano un'attività residuale della presenza della gamma-glutamyltransferasi nel colostro, ma affermano con chiarezza che esiste una netta attività enzimatica locale (*Figura 22*). Questo dato avvalorava dunque i risultati delle precedenti indagini come ulteriore conferma dei dati ottenuti dalle analisi. Inoltre, nello studio mediante utilizzazione della Real Time è stata valutata l'espressione dell'RNA messaggero che sintetizza per la gamma-glutamyltransferasi nei due gruppi sottoposti alla sperimentazione. I vitelli di 6 – 36 ore (*Gruppo 1*) hanno rappresentato il gruppo di riferimento ed hanno mostrato una maggiore attività enzimatica rispetto al secondo gruppo. Il gene di riferimento o *gene housekeeping* utilizzato in questo esperimento è stato il GADPH, il cui andamento è stato messo in relazione con quello della proteina *prionica* e con la *beta actina*, geni utilizzati come riferimento per la specie bufalina. Dal preparato, risulta chiaramente evidente che, con il passare delle ore, si osserva una *down regulation* dell'attività dell'enzima gamma-glutamyltransferasi in tutti i segmenti intestinali esaminati.

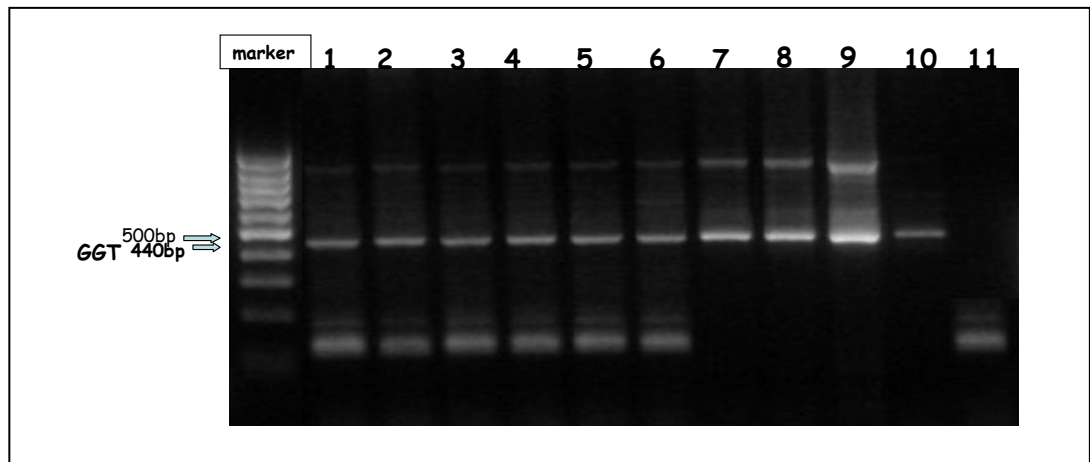


Figura 22: espressione dell'enzima gammaglutamiltransferasi mediante mRNA RT-PCR

Dove: 1=abomaso, 2=duodeno, 3=digiuno, 4=ileo, nel Gruppo 2

Dove: 5=abomaso, 6=duodeno, 7=digiuno, 8=ileo, nel gruppo 1

Dove: 9=fegato di vitello neonato, 10=rene di vitello neonato, 11=controllonegativo.

4.5 Conclusioni

I risultati di questo studio mostrano affinità tra la specie bovina e quella bufalina, quindi, suggeriscono che l'enzima gamma-glutamilttransferasi può costituire un valido marker indicativo di avvenuta ingestione colostrale nel vitello bufalino. Inoltre, la riduzione dei valori di immunoglobuline colostrali con l'allontanarsi dal parto è parallelamente correlata ad una riduzione dell'assorbimento intestinale delle stesse. A livello alveolare mammario, dunque, dove avviene la sintesi dei precursori proteici, si ha nel contempo la formazione di immunoglobuline, che sono assorbite a livello di epitelio intestinale in misura maggiore, se non esclusiva, nel primo giorno di vita del vitello. È interessante il riscontro di differenti pattern per le frazioni proteiche globuliniche: ad un significativo incremento delle gamma-globuline segue un decremento delle alfa-globuline e dell'albumina, mentre i valori delle beta-globuline permangono invariati.

A livello delle varie porzioni intestinali esaminate è stata rilevata la presenza dell'enzima a diverse concentrazioni nella prima settimana di vita. La presenza di mRNA in tutti i tratti indica che l'attività dell'enzima testato non rappresenta un residuo di attività enzimatica proveniente dal colostro, ma origina direttamente dall'epitelio della mucosa intestinale. Tale attività risulta massima nel piccolo intestino (duodeno e digiuno), distretti in cui avviene il massimo assorbimento della componente proteica introdotta con gli alimenti. Inoltre, la presenza di una intensa attività enzimatica nel *Gruppo 1* (6-36 h di vita) rispetto al *Gruppo 2* (36-168 h di vita) sembra coincidere con il periodo di massimo assorbimento dell'epitelio intestinale alle macromolecole di natura proteica.

4.6 Riferimenti bibliografici

- **Besser T.E., Hancock D.D., LeJeune J.T., Park J-H.:** Environmental reservoirs of *Escherichia coli* O157:H7 on cattle farms. *Korean J. Veterinary Public Health* 21:65-73, 1997.
- **Bogin E., Avidar Y., Shenkler S., Israeli B.A., Spiegel N., Cohen R.:** A rapid field test for the determination of cholostral ingestion by calves, based on γ -glutamyltransferase. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 31: 695-699, 1993.
- **Donovan D.C., Reber A.J., Gabbard J.D., Aceves-Avila M., Galland K.L., Holbert K.A., Ely L.O., Hurley D.J.:** Effect of maternal cells transferred with colostrum on cellular responses to pathogen antigens in neonatal calves. *American Journal of Veterinary Research* 68(7): 778-782, 2007.
- **Foster D.M., Smith G.W., Sanner T.N., Busso G.V.:** Serum IgG and total protein concentrations in dairy calves fed two colostrum replacement products. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 229(8): 1282-1285, 2006.
- **Gornall A.G., Bardawill C.J.H., David D.D.:** Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J Biol Chem*, 177: 751-66, 1949.
- **Hafez ESE:** Biologia e tecnologia della riproduzione nelle specie animali di interesse zootecnico. *Editoriale Grasso*, 1984.

- **Herriott D.E., Hancock D.D., Ebel E.D., Carpenter L.V., Rice D.H., Besser T.E.:** Association of herd management factors with colonization of dairy cattle by Shiga toxin-positive *Escherichia coli* O157. *J Food Protect* 61:802- 807, 1998.

- **Holloway N., Tyler J., Lakritz J. , Carlson S., Holle J.:** Serum immunoglobulin G concentrations in calves fed fresh and frozen colostrum. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 219 (3): 357-359, 2001.

- **Larson R.L. , Tyler J.W. , Schultz L.G. , Tessman R.K. , Hostetler D.E.:** Management strategies to decrease calf death losses in beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224(1): 42-48, 2004.

- **Livak K.J., Schmittgen T.D.:** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402-8, 2001.

- **Logan E.F., McBeath O.G., Lowman B.G.:** Quantitative studies on serum immunoglobulin levels in suckled calves from birth to five weeks. *Vet Record*, 94: 367-70, 1974.

- **Lombardi P., Avallone L., Pagnini U., d'Angelo D., Bogin E.:** Evaluation of buffalo colostrum quality by estimation of enzyme activity levels. *J Food Prot.* 64(8):1265-7, 2001.

- **Lombardi P., Avallone L., Pagnini U., d'Angelo D., Bogin E.:** Evaluation of buffalo colostrum quality by estimation of enzyme activity. *Journal of Food Protection*, 64(8): 265-7, 2001.

- **Lombardi P., Avallone L., Pelagalli A., Pagnini U., Pero M.E., Bogin E.:** Milk enzymes as markers for immunoglobulins content in buffalo colostrum. *Proceedings of World Veterinary Congress Lyon, 1999.*

- **Lombardi P., Avallone L., Pelagalli A., Pagnini U., Pero M.E., Bogin E.:** The correlation between Gamma-glutamyltransferase and proteins in raw milk from bovine and buffalo cows. *Revue de medicine Veterinarie 151 (7):731, 2000.*

- **Maden M., Altunok V., Birdane F.M., Aslan V., Nizamlioglu M.:** Blood and Colostrum/Milk Serum Gamma-Glutamyltransferase Activity as a Predictor of Passive Transfer Status in Lambs. *J. Vet. Med. B, 50: 128-131, 2003.*

- **Matte J.J., Girrard C.L., Seaone J.R., Braisson G.J.:** Absorbtion of colostral immunoglobulin G in newwborn dairy calf. *J Dairy Sci, 65:1765-60, 1982.*

- **Parish S.M., Tyler J.W., Besser T.E., Gay C.C., Krtytenberg D.:** Prediction of serum IgG1 concentration in Holstein calves using serum gamma glutamyltransferase activity. *J Vet. Int. Med., 11: 6, 344-347, 1997.*

- **Perino L.J., Sutherland R.L., Woolen N.E.:** Serum gamma-glutamyl-transferase activity and protein concentration at birth and after suckling in calves with adequate passive transfer of immunoglobulin. *Am. J. Vet. Res., 54: 56-59, 1993.*

- **Pero M. E., Mirabella N., Lombardi P., Squillacioti C., De Luca A., Avallone L.:** Gammaglutamyltransferase activity in buffalo mammary tissue during lactation. *Animal Science, 82 : 351-354, 2006.*

- **Pero M.E., Pero M.E., Pelagalli A., Lombardi P., Florio S., Avallone L., d'Angelo A.:** La GGT e la sintesi di colostro nei ruminanti e nell'uomo. Studio comparativo. *Giornate Scientifiche*. 127, 2001.

- **Petrie L.:** Maximizing the absorbption of colostral immunoglobulins in the newwborn dairy calf. *Vet Record*, 114: 157-63, 1984.

- **Rice D.H., Hancock D.D., Besser T.E.:** Verotoxigenic E. coli O157 colonization of wild deer and range cattle. *Veterinary Record*. 137:524, 1995.

- **Rutenburg A.R., Kim H., Fischbein J.W., Hanker J.S. , wasserkrug H.L., Seligman A.M.:** Histochemicaland ultrastructuraldemonstration of γ -glutamil transpeptidase activity. *The journal of Histochemistry and Citochemistry*, 17 (8): 517- 526, 1968.

- **Scott G.H., Marks D.B., Menettee B.E., Nighengale G.TJ.:** Colostral immunoglobulin transfer in calves. I period of absorbtion. *J Dairy Sci*, 62: 1632-8, 1979.

- **Tessmann R.K., Tyler J.W., Parish S.M., Johnson D.L., Gant R.G., Grasseschi H.A.:** Use of age and serum gamma-glutamyltransferase activity to asses passive transfer status in lambs. *JAVMA*, , 211: 9, 1163-1164, 1997.

- **Zarrilli A, Micera E., Lacarpia N., Lombardi P., Pero M.E., Pelagalli A., d'Angelo D., Mattia M., Avallone L.:** Evaluation of ewe colostrum quality by estimation of enzyme activity levels. *Revue de Medecine Veterinaire*, 154(8-9), 521-523, 2003.

CAPITOLO 5

RUOLO DEL GLUTATIONE QUALE SUBSTRATO PER LA FUNZIONALITÀ DEL SISTEMA GAMMA- GLUTAMILTRANSFERASI NELLA SECREZIONE DELLA COMPONENTE PROTEICA DEL LATTE BUFALINO

5.1 Introduzione

Il glutathione, noto anche con l'acronimo GSH (*gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine*) è un tripeptide cellulare costituito da amminoacidi essenziali, quali l'acido glutamico, la glicina e la cisteina. Il glutathione riveste un ruolo cruciale nel mantenimento di un equilibrio fisiologico tra pro-ossidanti e anti-ossidanti. Recenti studi affermano che il glutathione si ritrova nell'organismo in varie forme: glutathione ridotto (GSH), glutathione ossidato (GSSG), S-nitrosoglutathione (GSNO). Esiste una chiara relazione tra i livelli delle diverse forme di glutathione e la regolazione del metabolismo cellulare. Pertanto, ogni forma può risultare utile o nociva all'organismo a seconda del tipo cellulare coinvolto o dello *status* metabolico; partendo da tali premesse, risulta evidente che incrementi della concentrazione di glutathione possono costituire un vero sostegno per l'indirizzo terapeutico di una indagine clinica.

Presente in forma ubiquitaria nell'organismo, il GSH è considerato il più potente antiossidante endogeno: ha infatti un'azione di difesa contro i radicali liberi (ROS ed RNS)¹⁷⁰, contro il perossido di idrogeno, i nitrati, i nitriti, i benzoati e altre molecole potenzialmente dannose per l'organismo. Esso ha altresì funzione inibente i processi ossidativi a carico dei globuli rossi: la carenza di GSH, congenita o acquisita, determina un precoce invecchiamento (cellulare, sistemico ed organico) conseguente ad un alterato metabolismo ossidativo, che si rende responsabile di una anomala o addirittura assente eliminazione di sostanze tossiche.

Il GSH (*forma ridotta*) origina dalla scissione del Glutathione Disulfide (GSSG) ad opera dell'enzima Glutathione reduttasi. Per poter aver luogo, la reazione necessita dell'intervento del coenzima NADPH (*nicotinamide adenin*

¹⁷⁰ ROS: *reactive oxygen species* (composti reattivi dell'ossigeno) responsabili di stress ossidativo; RNS: *reactive nitrogen species* (composti reattivi dell'azoto), responsabili di stress nitrosoattivo.

dinucleotide fosfato). Il GSSG è considerato una *forma ossidata* della molecola ed è formato da due molecole di GSH unite da un ponte disolfuro, da cui la denominazione glutatione disolfuro (*Figura 23*).

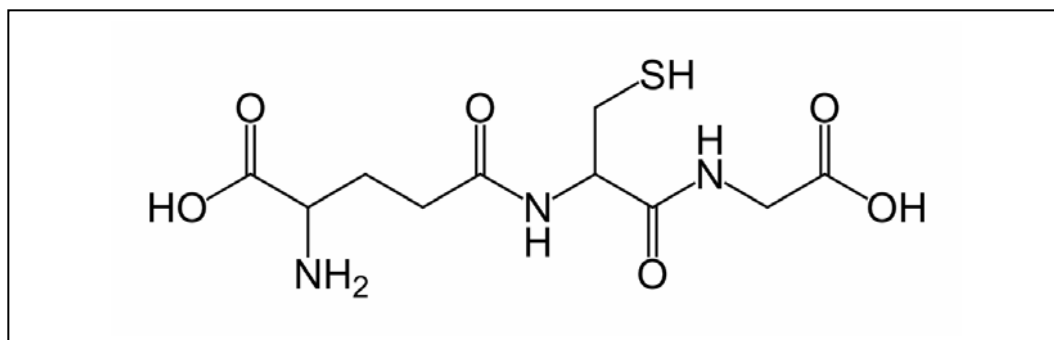


Figura 23: struttura chimica del glutatione disolfuro.

Esiste un apporto esogeno di glutatione che viene assorbito a livello intestinale in forma ridotta. La biosintesi endogena a partire dai precursori risulta, invece, senz'altro la componente maggiormente rappresentata nell'organismo.

È noto che la glicina è un componente abbondante del latte e delle uova la cisteina invece risulta piuttosto scarsa negli alimenti, essa deriva dall'amminoacido cistina, formato da due molecole di cisteina; peraltro la cisteina esogena viene catabolizzata rapidamente nell'organismo, per questa ragione l'organismo preferisce conservare stabilmente la cistina, in modo tale da operarne una scissione nelle sue due componenti qualora necessari dell'amminoacido non altrimenti disponibile. La somministrazione postatale di glicina induce un incremento dei livelli di GSH nei bambini nati pretermine¹⁷¹.

Le azioni fondamentali attualmente riconosciute al glutatione sono:

- Azione antiossidante;
- Azione disintossicante;
- Azione immunitaria;
- Azione protettiva nei confronti del SNC.

L'azione antiossidante del glutatione ha una importanza fondamentale per l'organismo e la scoperta di questa funzione ha recentemente suscitato molto

¹⁷¹ Cfr: Te Braake, 2008.

interesse nel mondo scientifico. La principale funzione del GSH è fungere da donatore di elettroni (carica negativa) nella reazione catalizzata dalla *glutathione perossidasi*: quando nell'organismo uno stress ossidativo induce la produzione di perossidi, si determina appunto questa reazione, che produce come prodotti finali acqua, alcool ed una molecola di glutathione disolfuro (GSSG). Questa reazione ha un significato biologico altissimo, in quanto, in questo modo, vengono eliminate tossine e prodotti nocivi, come ad esempio il perossido di idrogeno (carico di ioni positivi). La riconversione della forma ossidata in quella ridotta avviene ininterrottamente nell'organismo ad opera della *glutathione reduttasi*. Pertanto, il glutathione ridotto risulta indispensabile per la rimozione dei radicali liberi, che si formano non solo abitualmente nel corso del fisiologico turnover cellulare legato all'invecchiamento, ma anche in corso di numerose patologie degenerative. L'azione disintossicante, non meno importante della prima, si esplica con differenti modalità:

- *azione chelante* che impedisce che metalli pesanti (piombo, mercurio, alluminio etc.) e altri tossici (alcool, tabacco, droghe) operino un legame con i gruppi $-SH$ appartenenti alle proteine tissutali e ad alcuni enzimi, legame che inevitabilmente ne produce un deterioramento. Tramite questa azione il glutathione, dunque, blocca tali sostanze nocive per l'organismo e ne rende più agevole e rapida l'eliminazione.
- *azione favorente la biodisponibilità di ferro*, operata nei confronti di tossici di provenienza esogena. Questi elementi (nitrati, nitriti, anilina, derivati del benzolo) causano l'ossidazione del ferro esogeno convertendolo dalla sua naturale forma ferrica (Fe^{2+}) nella forma ferrosa (Fe^{3+}); in tal modo il ferro non risulta più idoneo per la composizione dell'emoglobina, pertanto viene irrimediabilmente alterata la capacità del sangue di trasportare ossigeno, con conseguente formazione di metaemoglobina e ipossia.

L'azione di protezione del sistema immunitario inoltre, è esplicata dal glutathione in forma ridotta. È noto che una riduzione dei livelli endogeni di glutathione si

riscontra in numerose patologie¹⁷² e in corso di senescenza, pertanto, intervenendo sul livello di GSH e incrementandone la concentrazione si interviene con risultati positivi sul potenziamento dell'attività del sistema immunitario. Inoltre, recenti studi rivelano che variazioni della concentrazione del glutathione influenzano notevolmente i globuli bianchi, con ripercussioni di non poco conto sulla risposta immunitaria¹⁷³. La chemiotassi leucocitaria risulta infatti sensibilmente influenzata dal livello di glutathione¹⁷⁴.

Infine, sembrerebbe accertata una importante azione protettiva nei riguardi del SNC; in particolare numerose ricerche sono state condotte per valutare il ruolo del GSH in patologie neurodegenerative quali il morbo di Parkinson ed il Morbo di Alzheimer e, quale potente inibitore della formazione di radicali liberi, il glutathione si conferma il più potente antiossidante cerebrale.

Sulla base di queste premesse, si è incentrato il nostro interesse sul coinvolgimento dell'enzima gamma-glutamyltransferasi nel determinismo dell'attività antiossidante mediata dal glutathione¹⁷⁵. Esso, come noto, costituisce il substrato elettivo dell'enzima gamma-glutamyltransferasi per la sintesi di nuovi amminoacidi¹⁷⁶. La gamma-glutamyltransferasi è, come detto, una glicoproteina eterodimerica combinata con la plasmamembrana che opera la degradazione del glutathione extracellulare¹⁷⁷. La scissione del glutathione, mediato dalla GGT in cisteinil-glicina e in un residuo gamma-glutamilico fornisce l'interpretazione del meccanismo del reintegro della cisteina nelle cellule e quindi del rinnovo della sintesi di glutathione. Questo concetto ha un altissimo significato biologico vista l'importanza di questo amminoacido nella costituzione del GSH.

È noto, peraltro, che l'enzima gamma-glutamyltransferasi svolge un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi dell'antiossidante glutathione¹⁷⁸. Pertanto, è accertato che nelle fasi precancerose e cancerose a carico del parenchima epatico si verificano significative modifiche delle attività specifiche della GGT.

¹⁷² Cfr: Kameoka M. et al., 1996; Marmor M. et al., 1997.

¹⁷³ Droge W. et al., 1994; Villa P. et al., 2002.

¹⁷⁴ Elferink J.G. e De Koster B.M., 1991.

¹⁷⁵ Cfr: Biliska A., 2007.

¹⁷⁶ Cfr: Vina J. R. et al., 1989; Zhang H., Forman H.J., Choi J., 2006.

¹⁷⁷ Cfr: Deng-Fu Yao e Zhi-Zhen Dong, 2007.

¹⁷⁸ Cfr: Pandur S., 2007.

Incrementi dell'attività della GGT possono, dunque, essere messi in relazione ad uno stress di natura ossidativa che può favorire l'incremento di precursori del glutathione nelle cellule¹⁷⁹.

Le due subunità della gamma-glutamyltransferasi sono codificate da un mRNA comune¹⁸⁰; esse sono localizzate sulla superficie esterna della plasmamembrana e rivestono un ruolo determinante nel trasporto del glutathione¹⁸¹. Quindi, una carenza o un incremento della concentrazione enzimatica dell'enzima si ripercuotono necessariamente sull'efficacia produttiva del GSH. L'interesse suscitato dal glutathione e le relazioni intercorrenti con la GGT rivestono un notevole interesse che può abbracciare più di una branca della conoscenza scientifica, essendo ancora molti i campi inesplorati e che si prestano bene a studi multidisciplinari in grado di cogliere i diversi aspetti della complessa funzione di questi due importanti elementi biologici.

¹⁷⁹ Whitfield J.B., 2001; Lee D.H. *et al.*, 2004.

¹⁸⁰ Finidori J. *et al.*, 1984; Nash R. *et al.*, 1984.

¹⁸¹ Curthoys N. P., 1983.

5.2 Obiettivi della ricerca

Il presente studio nasce con l'intento di valutare la presenza del glutathione (GSH) nella ghiandola mammaria di bufala, nel colostro e nel siero di vitelli bufalini neonati e di considerare la possibilità che questo elemento subisca una degradazione ad opera dell'enzima gamma-glutamyltransferasi (GGT).

Pertanto, sono stati valutati i livelli di glutathione nelle diverse matrici biologiche sia prima che dopo l'inibizione operata dall'enzima GGT, al fine di dimostrare il ruolo dell'enzima nell'induzione del catabolismo del GSH.

5.3 Materiali e Metodi

5.3.1 Misure sperimentali

Tutti i campioni biologici sono stati prelevati dall'allevamento di cui detto in precedenza nell'ottobre 2006. Le femmine oggetto della sperimentazione risultavano omogenee per peso vivo, condizioni di alimentazione, stabulazione e periodo riproduttivo. Non avevano subito nessun trattamento terapeutico nelle tre settimane precedenti il campionamento. Nel trial sperimentale sono stati inclusi anche i vitelli neonati, che hanno ingerito colostro materno nelle ore immediatamente successive alla nascita.

5.3.2 Raccolta dei campioni

Nel protocollo sperimentale sono state incluse 8 femmine di bufalo ed i rispettivi 8 neonati. Dalle bufale è stato prelevato colostro destinato alle analisi di laboratorio e conservato a temperatura di refrigerazione; immediatamente dopo il parto, sono stati effettuati prelievi biotici¹⁸² dalla ghiandola mammaria (10-20 mg), tenendo cura di effettuare una accurata detersione della mammella, con conseguente disinfezione ed anestesia¹⁸³. Tali campioni sono stati idoneamente aliquotati e stoccati.

Dai vitelli è stato effettuato un prelievo ematico, ottenuto mediante puntura della giugulare.

¹⁸² Apparato per biopsie: Magnum Biopsy Needles.

¹⁸³ Protocollo anestesilogico: iniezioni sottocutanee di lidocaina 2%.

5.3.3 Determinazione enzimatica della gamma-glutamyltransferasi nel colostro nel tessuto mammario e nel siero

I campioni di colostro prelevati nel primo giorno di lattazione sono stati centrifugati (3500 x g) per rimuovere la componente lipidica, successivamente sono stati ultracentrifugati (20.000 x g per 30 minuti). In seguito a separazione in fasi, lo strato intermedio è stato utilizzato per le analisi.

Sui tessuti provenienti dalla ghiandola mammaria sono stati effettuati lavaggi, dopodichè sono stati sottoposti ad accurata omogeneizzazione¹⁸⁴. Gli omogenati così ottenuti sono stati centrifugati (3000 g per 15 minuti)¹⁸⁵, il surnatante è stato destinato alle analisi.

Dal sangue dei vitelli neonati, mediante appropriata centrifugazione, è stato ottenuto siero.

L'enzima gamma-glutamyl transferasi è stato determinato mediante lettura spettrofotometrica¹⁸⁶. Ogni esperimento è stato condotto in duplicato.

5.3.4 Determinazione del glutathione nel colostro, nel tessuto mammario e nel siero

Per tutte le matrici biologiche oggetto dell'indagine è stato seguito il protocollo di preparazione per la determinazione dei livelli di glutathione. Una aliquota di ogni campione (controllo) è stata deproteinata mediante una soluzione (1:1) acquosa di acido metafosforico (5g/50ml) e successivamente una soluzione di trietanolamina 4M. Il GSH è stato misurato mediante metodica ELISA¹⁸⁷.

¹⁸⁴ Protocollo: 10-20mg/200µl di PBS1x con Janke& Kunkel IKA-WERK ultra-Turrax.

¹⁸⁵ Cfr: Rico A.G. et al., 1977.

¹⁸⁶ Materiale: reagenti della Spinreact, Spain.

¹⁸⁷ Materiale: kit per glutathione, Cayman Chemical, USA:

5.3.5 Elaborazione statistica dei dati

La relazione tra GGT e GSH nei diversi tessuti è stata analizzata tramite lo Spearman Rank Test¹⁸⁸. Ogni test è stato effettuato in duplicato e la media è stata utilizzata per l'analisi statistica.. Sono state considerate significative valori di $P < 0.05$.

¹⁸⁸ Statistical Analysis Systems Institute, 1985.

5.4 Risultati

5.4.1 Determinazione dell'attività della gamma-glutamyltransferasi e del glutathione nel colostro

L'attività enzimatica tissutale della gamma-glutamyltransferasi è stata misurata con l'intento di accertare l'inattivazione del glutathione ad opera dell'enzima.

Nel colostro sono state osservate elevate concentrazioni di GSH ($894 \pm 39 \mu\text{M}$).

È stata rilevata una significativa correlazione negativa ($R^2=0.63$) tra i livelli di gamma-glutamyltransferasi e di glutathione presenti nel colostro. Questi dati suggeriscono che l'enzima utilizzi il GSH quale substrato per il suo metabolismo. I livelli di glutathione rinvenuti nel colostro sono apparsi molto più elevati rispetto a quelli presenti nel siero di vitello neonato. Ciò a sostegno dell'ipotesi che il glutathione non perviene nel colostro per via paracellulare, ma direttamente dalle cellule epiteliali mammarie (*Figura 24*).

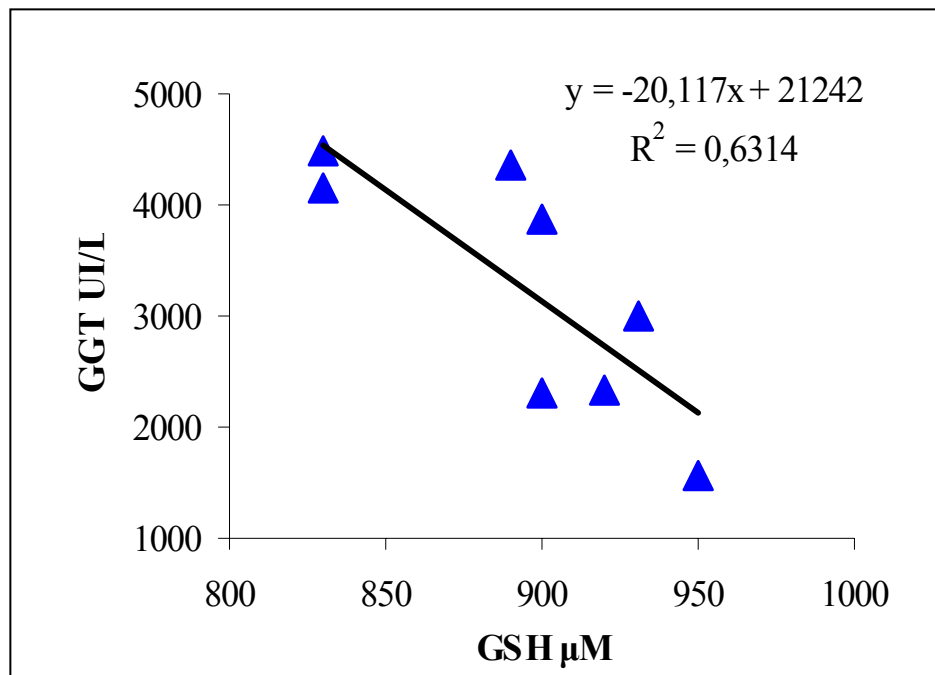


Figura 24: Relazione tra GGT (UI/l) e GSH (μM) nel colostro del primo giorno di lattazione.

5.4.2 Determinazione della gamma-glutamyltransferasi e del glutatione nel tessuto ghiandolare mammario

Un trend analogo è stato apprezzato per gli omogenati tissutali provenienti dalla ghiandola mammaria; ciò dimostra che il glutatione è secreto a livello colostrale ed è in parte degradato dalla gamma-glutamyltransferasi.

Una relazione significativa è stata inoltre evidenziata nel tessuto mammario, a riprova che la GGT e il GSH sono coinvolti nella colostrogenesi e probabilmente hanno un ruolo nella sintesi della componente proteica del colostro (*Figura 25*).

Infatti, nel tessuto mammario, nel primo giorno di lattazione sono stati osservati livelli di glutatione pari a $1150 \pm 125 \mu\text{M}$. Inoltre, sono stati riscontrati valori decisamente elevati della concentrazione enzimatica della gamma-glutamyltransferasi ($4.6 \pm 4.8 \text{ U/g}$).

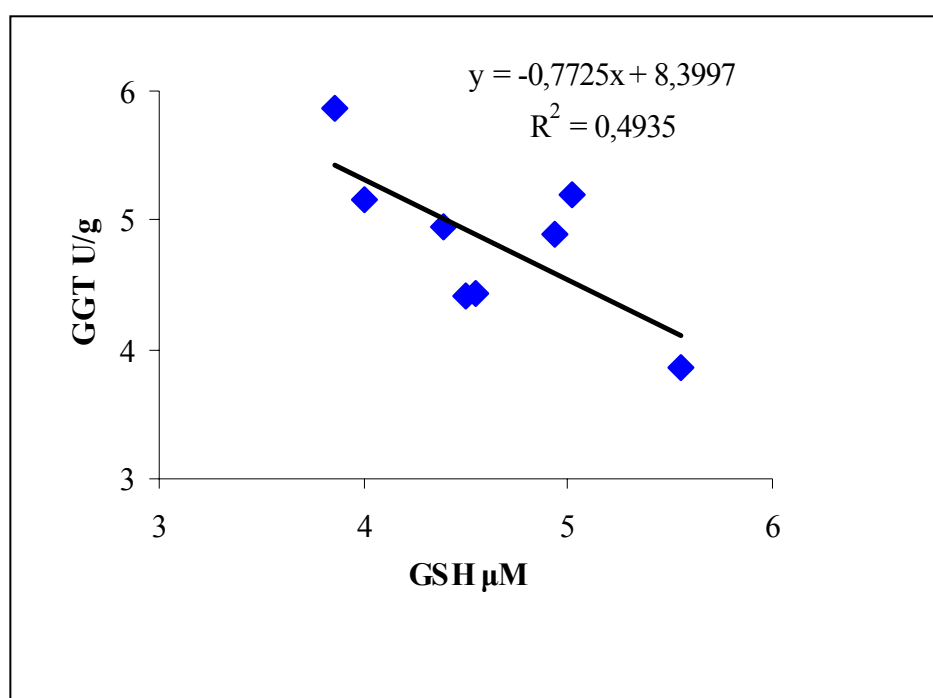


Figura 25: Relazione tra GGT (UI/l) e GSH (μM) nel tessuto mammario di bufala durante il primo giorno di lattazione

5.4.3 Determinazione della gamma-glutamilttransferasi e del glutatione nel siero di vitello bufalino neonato

Non sono state rilevate correlazioni significative tra i livelli di GGT e quelli del GSH nel siero di vitelli neonati (*Figura 26*). La concentrazione sierica di glutatione è risultata estremamente bassa ($5.9 \pm 2.9 \mu\text{M}$) in accordo ai dati rilevati in letteratura¹⁸⁹.

Questi dati suggeriscono che il catabolismo del sistema delle gamma-glutamilttransferasi medi la riduzione del glutatione a livello del compartimento mammario. Tale attività dell'enzima, quindi, si esaurirebbe a questo livello ed i valori sierici delle due sostanze risultano indipendenti.

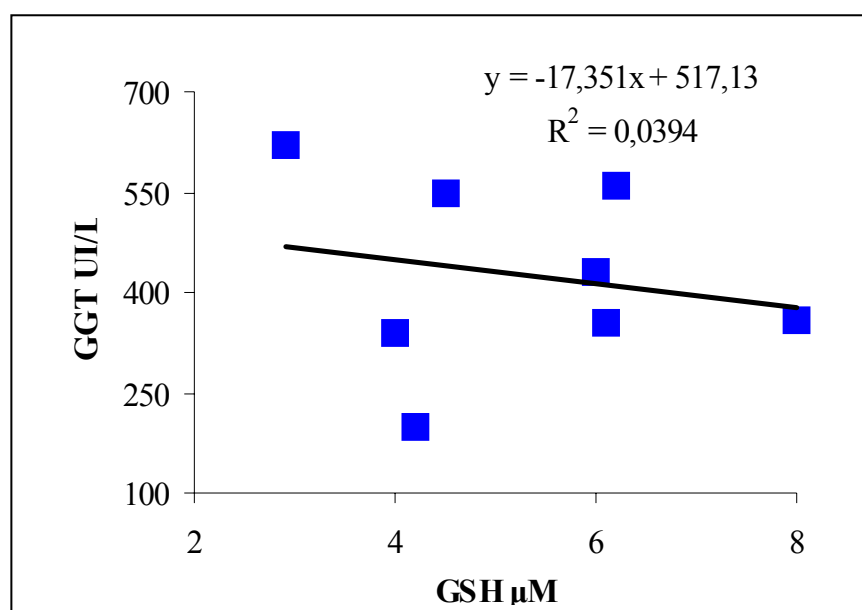


Figura 26: Relazione tra GGT (UI/l) e GSH (μM) nel siero di vitello bufalino durante il primo giorno di lattazione

¹⁸⁹ Cfr: Meister A., 1983.

5.5 Conclusioni

Il ritrovamento del glutathione nel colostro di bufala è un importante reperto, in quanto se da un lato accresce le conoscenze su questo secreto, dall'altro fornisce un dato significativo sull'importanza di fattori antiossidanti nella nutrizione neonatale.

I dati mostrano che in assenza di attività della gamma-glutamyltransferasi, i livelli di glutathione non sono influenzati; pertanto, consegue che, essendo il glutathione secreto nel colostro bufalino e rinvenendo che una frazione è degradata dalla gamma-glutamyltransferasi, consegue inequivocabilmente che l'enzima utilizzi il GSH quale substrato per il suo metabolismo. Una porzione di GSH, normalmente secreta nel latte è, dunque, degradata dall'enzima gamma-glutamyltransferasi.

La presenza del GSH nel colostro può costituire un punto di partenza per nuove ricerche sui rapporti intercorrenti tra questo elemento ed altri enzimi, col fine di indagare più accuratamente il ruolo di questi composti nel secreto mammario. Ad esempio, è noto che la contemporanea presenza di antiossidanti e xenobiotici nel latte risultano influenzati da molteplici fattori sia fisiologici che ambientali e che siano proprio le interazioni tra questi fattori ad indurre conseguenze importanti sullo stato di salute generale del neonato, pertanto, uno studio delle relazioni intercorrenti tra enzimi e glutathione possono fornire conoscenze importanti circa i meccanismi che regolano la produzione di questo importante fattore antiossidante.

Questi risultati, peraltro, esplorano anche il ruolo dell'enzima gamma-glutamyltransferasi nel tessuto mammario: è noto che l'enzima sia ritrovato in elevate concentrazioni in questo tessuto e soprattutto nel primo periodo della lattazione, come dimostrato nelle precedenti fasi di ricerca, tuttavia i dati di questo lavoro arricchiscono le nostre precedenti conoscenze, in quanto forniscono le basi scientifiche per affermare la presenza di un coinvolgimento dell'enzima nella degradazione del glutathione, evento che presuppone la liberazione della cisteina nel latte bufalino.

Infatti, partendo da dati bibliografici che indicavano la presenza di enzimi con funzione sintetica e catabolica che interagivano con il GSH, questi risultati riferiscono della possibilità dell'esistenza di un ciclo gamma-glutamilico a livello ghiandolare mammario. Conseguentemente sarebbe in tal modo spiegato il rilievo di elevate concentrazioni di cisteina nel colostro e successivamente nel latte bufalino, amminoacido notoriamente fondamentale per lo sviluppo e l'accrescimento del neonato.

CAPITOLO 6

DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

6.1 Analisi finale e prospettive

Nel corso della sperimentazione la scelta delle aziende in cui sono stati effettuati i campionamenti ha avuto un impatto fondamentale sul buon esito dell'indagine; l'obiettivo di indagare sulla composizione del colostro e del latte di bufala e quindi di volerne valutare la componente proteica (Immunoglobuline colostrali e caseina) è stato inscindibile da un corretto razionamento avvenuto durante l'intero periodo di gravidanza e nella successiva fase di lattazione. L'alimentazione di tutte le femmine è stata effettuata secondo un preciso protocollo che prevedeva apporti protidici, lipidici, glucidici e vitaminici specifici per le gestanti e per la delicata fase dell'allattamento. Se con la dieta l'apporto proteico giornaliero risultava uguale per tutte le femmine sottoposte a sperimentazione, registrando invece un diverso contenuto colostrale di immunoglobuline, si è dedotto che tale parametro, sebbene sia in parte geneticamente predeterminato, è pur tuttavia sotto l'influenza di alcuni fattori, difficilmente identificabili con una sommaria osservazione.

È noto da tempo, peraltro, che una dieta ad elevato contenuto proteico somministrata alle madri incide favorevolmente sulla sintesi di colostro di buona qualità e sulla produzione di dosi ragionevoli che assicurano una corretta immunizzazione neonatale dei vitelli.

Numerosi altri fattori, inoltre, possono influenzare la sintesi di immunoglobuline colostrali. La capacità di ingestione ad esempio può risultare determinante ai fini di una assunzione ottimale della dieta. Uno sviluppo inferiore del comparto gastrico anteriore comporta irrimediabilmente una più modesta ingestione di cibo che si traduce in una resa scadente; nel nostro caso, ad esempio per resa scadente si intende sia la produzione di colostro a bassa concentrazione immunoglobulinica, sia la produzione di piccoli volumi di colostro. Lo stesso vale per l'appetibilità dell'alimento, fattore che può essere senz'altro migliorabile con semplici sostituzioni delle ditte produttrici di alimento secco o ancora correggendo il management aziendale migliorando le modalità di conservazione

degli alimenti maggiormente deteriorabili. Non bisogna inoltre sottovalutare l'influenza del management aziendale sulle capacità produttive e riproduttive: l'importanza della condizione di stabulazione libera che vige per l'allevamento bufalino, ad esempio, apporta benefici indiscutibili che sono altamente riconosciuti e quasi imprescindibili dal carattere rustico della bufala che poco e malvolentieri si lascia circoscrivere in spazi angusti e solitari. Tuttavia, proprio a motivo di questa condizione di allevamento, difficilmente gli animali possono sottrarsi a prevaricazioni o limitazioni effettuate dalle femmine dominanti, che esercitano la loro gerarchia senza remore sulle altre componenti del gruppo. Sicuramente questa condizione induce alcuni animali a nutrirsi di più e a scegliere gli alimenti migliori rispetto ad altri; ma non solo, la condizione di dominanza impone la preferenza di quelle condizioni ambientali ottimali (riparo dalla luce, dalle intemperie, postazione per riposare, mangiatoie meglio disponibili, acqua, stagnetto per rinfrescarsi) che giovano enormemente al benessere dell'animale, con ripercussioni non trascurabili sull'utilizzazione delle risorse fornite con la dieta.

Un ulteriore parametro che ha inciso sul campionamento è stato, inoltre, la valutazione dello stato di salute degli animali: la sanità delle femmine e dei vitelli sottoposti all'*iter* sperimentale è risultato di estremo valore per il corretto svolgimento dell'indagine, in quanto escludere tutte le affezioni causanti ridotto assorbimento proteico, a partire dalle più banali (patologie della dentizione, zoppie che impedivano l'approvvigionamento) fino alle cause infettive e infestive generanti diarrea proteino-disperdente ha consentito di escludere una variabile che avrebbe potuto incidere significativamente sulla produzione della componente proteica del colostro e del latte. Se alcune di queste condizioni, come quelle precedentemente esposte, sono state poco archiviabili scientificamente, tuttavia, altre informazioni ci hanno consentito una uniformità di presupposti molto significativa ai fini della sperimentazione, con una standardizzazione ottimale delle condizioni di ricerca.

Pertanto, dai dati ottenuti dall'indagine è emersa la capacità di alcune femmine di produrre colostro di migliore qualità, ovvero maggiormente ricco della frazione immunoglobulinica rispetto ad altre; la maggiore presenza di immunoglobuline

colostrali è stata avvalorata dal nostro studio che ha ritrovato in questi colostri una maggiore espressione dell'enzima gamma-glutamyltransferasi e delle gamma-globuline, evento inequivocabile del suo ruolo nel conferimento dell'immunità passiva. Se dunque un colostro è di ottima fattura, a monte esiste una ghiandola mammaria efficiente. Peraltro, grazie all'impiego ordinario di test biochimici che valutano direttamente sul campo l'attività dell'enzima gamma-glutamyltransferasi nel secreto mammario si è potuto formulare un archivio dati con la funzione di catalogare le femmine migliori produttrici di colostro, di quantificare la loro produzione e disporre in tal modo di una cosiddetta "*banca del colostro*", con il significato di una reperibilità immediata del prodotto qualitativamente migliore in quantità elevate. Pertanto, la valutazione enzimatica della GGT effettuata nel contempo nel tessuto mammario e nel colostro è risultato un validissimo mezzo prognostico per la determinazione della qualità immunoglobulinica di questo fondamentale nutriente. Poter determinare con una metodica accessibilissima, perché poco costosa e di facile utilizzazione, quale femmina produce migliore colostro e scartare invece quei soggetti con produzione di colostro limitata o di scarsa qualità (primipare, femmine in condizioni di salute non ottimali, con patologie mammarie etc.) può costituire senz'altro una risorsa validissima per ridurre considerevolmente le perdite economiche conseguenti alla mortalità perinatale di vitelli che non hanno beneficiato di una adeguata immunizzazione. Avendo dunque completato lo studio sulle madri, la nostra indagine si è soffermata sul "ricevente", ovvero sul neonato agammaglobulinico che per sopravvivere necessariamente abbisogna di un apporto ottimale di immunoglobuline fornite dal colostro. Partendo dalle risorse fornite dalla letteratura, secondo cui il periodo ottimale per l'assorbimento intestinale della frazione proteica risulta essere precoce, abbiamo voluto indirizzare la nostra ricerca su due fronti, ovvero indagare quale fosse l'età, in termini di ore dalla nascita, in cui l'assorbimento risultasse massimo e quale segmento intestinale favorisse il più alto assorbimento; per far fronte a tali obiettivi la scelta della metodica scientifica, ovvero l'ausilio di test immuno-enzimatici per la determinazione dell'enzima gamma-glutamyltransferasi, ci è sembrata la più efficace. Anzitutto, lo studio della letteratura sull'argomento dava pochi segni

degni di nota sull'uso dell'enzima GGT svincolato dal suo ordinario impiego quale marker di patologie epato-biliari.

Pertanto, il nostro interesse è cresciuto verso questo agente quando, approfondendo le conoscenze sul suo meccanismo biochimico, si è fatta chiarezza sul modo di intervenire di questo sistema enzimatico in modo specifico nell'*uptake* degli amminoacidi durante le sintesi proteiche. Partendo da questi presupposti, abbiamo adattato le conoscenze scientifiche alla nostra ipotesi che intuiva il coinvolgimento della gamma-glutamyltransferasi nel processo produttivo, secretivo e assorbitivo della componente proteica del colostro.

Il nostro interesse è stato indirizzato, infine, all'ultima fase dell'immunizzazione passiva del vitello, che riguarda lo studio dei processi che presiedono all'assorbimento da parte del redo della componente immunoglobulinica fornita dal colostro. Senza un adeguato assorbimento gastro-intestinale, un colostro, fosse anche il migliore di una severa selezione, non ha capacità di espletare le sue funzioni qualora non risulti in grado di pervenire alla sede deputata alla sua utilizzazione. Pertanto, obiettivo primario del nostro studio è stato di eliminare tutte le cause patologiche che potessero interferire con un normale processo assorbitivo, tra queste, la nostra attenzione si è focalizzata soprattutto su tutte le cause generanti diarrea. Questo sintomo, talvolta espressione di una banale e lieve indisposizione, talvolta e purtroppo frequentemente nell'allevamento bufalino, espressione di patologie a carattere infettivo o parassitario, va gestito con oculatezza in un'azienda che non voglia subire perdite economiche rilevanti. Pertanto, escluse tutte le summenzionate cause che nel vitello compromettono l'assorbimento delle immunoglobuline colostrali e partendo da una somministrazione omogenea di tale elemento ai gruppi sottoposti a sperimentazione di colostro di buona qualità, abbiamo soffermato l'attenzione sul meccanismo assorbitivo che avviene a carico di alcuni tratti anatomici dell'apparato digerente del vitello. Ipotezzando l'intervento a questo livello della gamma-glutamyltransferasi, quale mediatore insostituibile dell'*uptake* amminoacidico, l'indagine ha indirizzato i propri sforzi nell'individuare a carico dell'enzima, la sua sede di produzione e la cronologia della massima intensità della sua attività, per comparare infine questi dati con l'effettivo passaggio delle

immunoglobuline colostrali dal sito di produzione (alveolo mammario) al sito deputato al suo assorbimento (villo intestinale).

I dati sono stati confortanti su più di un elemento: anzitutto hanno confermato che il picco massimo di assorbimento avviene durante le prime ore di vita; in particolare tra le 6 e le 36 ore si registra la più elevata capacità assorbitiva dell'epitelio intestinale alle macromolecole proteiche che tende indiscutibilmente a decrescere già nei successivi giorni fino a esaurirsi quasi del tutto nel corso della prima settimana dalla nascita (168 ore di vita). Di conseguenza, queste informazioni sono risultate significative sia per lo studioso che per l'allevatore; se tale periodo è il più propizio per l'assorbimento si sottintende che dopo tale fase avvengono cambiamenti che riducono l'efficienza di tale processo.

Ebbene, se prima delle 6 ore di vita il vitello è ancora impegnato nei primi movimenti, nella comprensione dell'ambiente che lo circonda, nella cognizione esatta delle sue primarie esigenze, nella ricerca del capezzolo, nell'apprendimento del meccanismo della suzione, immediatamente dopo questo periodo, ed in particolare fino a 36 ore dopo la nascita, l'assorbimento delle immunoglobuline materne col tramite del colostro risulta massimo, perché massima è la capacità intestinale di essere attraversata efficacemente da questi elementi. Dopo tale periodo si erge quasi una sorta di barriera che impedisce alla matrice proteica di funzionare in quel sito precedentemente deputato all'assorbimento. Nell'intestino avvengono, dunque, modificazioni significative sia morfologiche che funzionali che ne riassessano le capacità, i nuovi usi cui sarà deputato, i nuovi compiti cui dovrà assolvere. L'intestino riduce la propria permeabilità alle immunoglobuline colostrali dalle 36 ore di vita del redo in poi e questo ha un altissimo significato biologico se pensiamo che in natura una femmina allo stato brado non è in grado di fornire per un periodo, oltremodo lungo, un alimento di tale imponente valore, che giustifica, per effettuarne la produzione, degli sforzi massimali del metabolismo in un soggetto che ha appena concluso la difficile fase della gestazione. Le moderne tecniche di allevamento, che tendono a fornire alle gestanti tutti i nutrienti prontamente disponibili e con elevato valore nutrizionale, si inseriscono in questo panorama complesso e intervengono in questo delicato processo migliorando le condizioni alimentari e

ambientali con la finalità di assicurare una protezione efficace ai vitelli appena nati, che rappresentano le nuove risorse.

Se da un lato, quindi, l'allevatore sarà ben soddisfatto di sapere che deve concentrare i suoi sforzi in un periodo di tempo così breve che va dalla nascita del redo a poche ore dopo di essa e con una spesa fondamentale nulla, giacchè al massimo occorre supplementare la dieta materna al fine di produrre colostro di migliore qualità, dall'altro resta da chiarire perché la riduzione dell'assorbimento avviene dopo questa breve fase, quale segmento anatomico è responsabile di tale processo, quali sistemi biochimici sono coinvolti, così che dalle conoscenze dei meccanismi fisiologici acquisite ci si possa indirizzare verso l'adozione di procedure che tendano a migliorare o a preservare tale processo produttivo.

Dopo le 36 ore di vita, le esigenze biologiche cambiano: il neonato non ha dunque più bisogno di assorbire ulteriormente le immunoglobuline fornite dal colostro, dal momento che la sua copertura immunitaria è sufficiente alla sopravvivenza, esso ha adesso necessità di nutrienti per fabbricare le proprie proteine e per far fronte alla crescita; dalla ingestione di colostro gradualmente si deve passare ad un'alimentazione latte, questo passaggio graduale è ben colto dai risultati dei nostri preparati immunoistochimici e dai reperti enzimatici. Dai risultati del presente lavoro, infatti, appare come il duodeno, il digiuno e l'ileo sono massimamente coinvolti nel processo assorbitivo delle immunoglobuline colostrali. L'attività della gamma-glutamyltransferasi indica senza dubbio che la presenza di sintesi proteiche è massima dalle 6 ore di vita del vitello fino alle 40 ore, per poi decrescere gradualmente e scomparire ad una settimana di vita, come ad indicare che il ruolo preponderante di questi tratti anatomici è correlato al meccanismo assorbitivo e alla sintesi dei costituenti proteici necessari alla crescita. La specializzazione di questi segmenti intestinali (in particolare il duodeno) fornisce dunque una garanzia circa il corretto approvvigionamento di materie prime necessarie alla crescita. Pertanto, la conoscenza dei siti deputati a tali complesse reazioni ha un altissimo significato se pensiamo che il clinico può, sulla base di queste conoscenze, preservare tali zone da patologie che ne inficerebbero la corretta funzionalità.

Il reperimento di elevate concentrazioni dell'enzima gamma-glutamilttransferasi a livello dell'epitelio ghiandolare mammario durante la fase di lattazione suggerisce il coinvolgimento diretto dell'enzima in questo delicato processo. Studi condotti da Baumruker e Pocius sostengono che in omogenati di tessuto mammario appartenente alla specie bovina si evidenzino incrementi significativi dell'attività della gamma-glutamilttransferasi durante il periodo della lattazione¹⁹⁰. Peraltro, lavori sperimentali eseguiti in vitro su tessuto ghiandolare mammario ovino hanno osservato l'attività enzimatica della GGT durante la fase gravidica e durante la successiva lattazione; i risultati di questa indagine hanno evidenziato incrementi dell'attività della gamma-glutamilttransferasi in prossimità del parto e durante il primo periodo di lattazione. Inoltre, i livelli enzimatici registrati sono risultati di ben sei volte più elevati in questi soggetti piuttosto che in quelli non gravidi¹⁹¹.

Similmente, è stata riscontrata una correlazione fra l'attività della gamma-glutamilttransferasi e la lattazione nei roditori; in particolare nel primo periodo seguente il parto si verifica la massima espressione dell'attività dell'enzima¹⁹². Nel topo, infatti, è stato evidenziato che l'attività della GGT, presente in concentrazione minima nella ghiandola mammaria di animali prepuberi, aumenta progressivamente durante la gravidanza, per raggiungere un picco di attività, registrato con esperimenti di cinetica enzimatica, all'inizio della fase di lattazione, per poi rientrare rapidamente a livelli basali con lo svezzamento del piccolo¹⁹³.

Partendo da questi dati, la nostra indagine ha appurato che l'attività massima della GGT a livello di tessuto mammario bufalino si riscontra nei primi quattro mesi di lattazione, mentre la cinetica dell'enzima si mantiene su livelli significativamente inferiori nelle bufale in avanzato stadio di lattazione e nei soggetti non in lattazione. In questo contesto, inoltre, i risultati dell'indagine di Istochimica, se da un lato hanno convalidato i dati ottenuti con gli esperimenti di cinetica enzimatica, hanno d'altro canto ampliato il nostro archivio di

¹⁹⁰ Cfr: Baumruker and Pocius, 1978.

¹⁹¹ Cfr: Johnston et al., 2004.

¹⁹² Cfr: Puente et al., 1970; Pocius et al., 1980.

¹⁹³ Cfr: Siegrist et al., 1990.

conoscenze, andando a localizzare la sede di produzione della gamma-glutamyltransferasi nell'ambito della ghiandola mammaria bufalina.

È degno di nota il riscontro della massima intensità della reazione enzimatica a livello di epitelio alveolare, ovvero nel luogo deputato alla sintesi di tutti i precursori del secreto mammario ed ancora è fondamentale la prova che questo picco si evidenzia nel periodo che va dall'inizio della lattazione al 120° giorno, ovvero nel momento in cui il latte è qualitativamente migliore e quantitativamente più abbondante. Inoltre, il reperto della maggiore intensità dell'attività della GGT nei granuli di dimensioni maggiori presenti nelle cellule epiteliali degli alveoli in corso di lattazione consente di legare indissolubilmente questa attività con la massima produzione lattea e, asserendo che l'enzima gamma-glutamyltransferasi risulti coinvolto nel meccanismo dell'*uptake* amminoacidico, questi dati non possono che avvalorare la nostra ipotesi, secondo cui tale sistema enzimatico ha un ruolo decisivo nella produzione della componente proteica del latte.

Pertanto, tali risultati potrebbero avere risvolti interessanti se ricerche interdisciplinari indagassero ulteriori aspetti di tale meccanismo. Ad esempio, rivestirebbe molto interesse concepire un sistema in grado di indurre un incremento dell'attività dell'enzima a livello di tessuto mammario, sfruttando queste conoscenze nel campo della produzione dei formaggi. Se la ghiandola mammaria fosse stimolata dalla GGT a produrre una maggiore frazione proteica, sicuramente la successiva fase di caseificazione del latte per la produzione di formaggi sarebbe facilitata o addirittura potrebbe avvenire in tempi più ridotti, riportando senz'altro dei vantaggi economici non trascurabili. Oppure l'incremento di tale sistema, inteso come incremento della quota proteica fornita dal secreto mammario, potrebbe garantire la produzione di latte con elevata concentrazione proteica, ovvero di alta qualità biologica e quindi offrire al consumatore un prodotto notevolmente interessante per le sue caratteristiche nutrizionali.

L'ulteriore interesse che ha, inoltre, mosso lo studio dell'attività del sistema enzimatico della gamma-glutamyltransferasi nel vitello bufalino è stato volto alla identificazione della regione anatomica dell'apparato digerente coinvolta nel

processo di sintesi della componente proteica, al fine di apprezzare se tale tratto intestinale potesse corrispondere all'area di maggiore assorbimento degli amminoacidi provenienti dal colostro e, quindi, se esistesse una correlazione fra assorbimento proteico/intensità dell'espressione enzimatica.

I dati ottenuti dalla nostra indagine mostrano la presenza dell'enzima lungo tutti i tratti anatomici sottoposti a sperimentazione, sebbene le concentrazioni della GGT siano diverse nelle varie sezioni anatomiche. È confortante il ritrovamento di un'attività più marcata della gamma-glutamyltransferasi nel momento immediatamente successivo alla nascita, periodo in cui l'intestino deve modellarsi e acquisire la capacità funzionale cui è preposto. In tutti i tratti, inoltre, è stata accertata la presenza di RNA messaggero, questo reperto suggerisce che l'attività della gamma-glutamyltransferasi origina direttamente a livello del tratto digerente, ed in particolare a livello di mucosa intestinale e non costituisce un residuo dell'attività enzimatica che, con i precedenti lavori, è stato dimostrato essere presente in elevate concentrazioni nel colostro. Esclusa tale possibilità, occorre dunque convenire che l'enzima svolge anche a livello intestinale di giovani vitelli bufalini un ruolo importante nel favorire l'assorbimento delle immunoglobuline colostrali.

In particolare, l'attività della GGT si mostra chiaramente più efficace nel tratto ascendente del duodeno e nel digiuno; tale sede non è casuale, in quanto, sappiamo essere questa la porzione dell'apparato digerente che maggiormente partecipa all'assorbimento della componente proteica introdotta con gli alimenti anche nei soggetti adulti. Peraltro, la presenza di un'attività della gamma-glutamyltransferasi più rilevante nei vitelli fino a 36 ore di vita suggerisce una relazione intercorrente tra questa maggiore espressione enzimatica e il periodo in cui l'epitelio intestinale risulta idoneo nella misura più alta all'assorbimento delle macromolecole di natura proteica.

Questi reperti sono avvalorati da numerosi lavori che sostengono che nelle primissime ore di vita, più precisamente tra le 6 e le 24 ore, si registrano i valori più elevati di permeabilità dell'intestino¹⁹⁴.

¹⁹⁴ Cfr: Matte J.J. et al., 1973.

Successivamente a tale fase dell'*iter* sperimentale, è stato dimostrato che l'epitelio intestinale diventa refrattario all'assorbimento delle macromolecole proteiche ed in misura maggiore delle immunoglobuline, indispensabili per l'acquisizione dell'immunità passiva nei ruminanti. Le modificazioni morfologiche e funzionali cui va incontro l'intestino nei primi giorni di vita risultano necessarie per favorire la specializzazione e la maturazione dell'epitelio col fine di rendersi capace di assorbire i nutrienti necessari alla costruzione delle componenti essenziali per far fronte alle esigenze di crescita; in tale processo un ruolo determinante sembra essere svolto dalla gamma-glutamyltransferasi¹⁹⁵. Questo enzima interviene attivamente nell'attività assorbitiva cui è deputato il tratto intestinale partecipando ai processi di traslocazione che vedono coinvolti gli amminoacidi. Una assenza dell'attività enzimatica nel primissimo periodo di vita è stata messa in relazione ad alterazioni irreversibile dell'epitelio intestinale con conseguente compromissione di una adeguata funzionalità che incide negativamente sull'acquisizione dell'immunità passiva.

A conferma di ciò, alcuni Autori, approfondendo lo studio dell'ultrastruttura del *brush border membrane* (BBM) o "orletto a spazzola" dell'epitelio intestinale, hanno individuato nella gamma-glutamyltransferasi un enzima che risente delle modificazioni funzionali dell'epitelio. Infatti, è stato accertato che i processi di trasporto degli aminoacidi e il loro assorbimento si riducono quando l'attività dell'enzima viene in qualche modo compromessa¹⁹⁶. In accordo con questi studi, è stata avanzata l'ipotesi dell'impiego della GGT quale marker di valutazione dell'integrità della mucosa intestinale.

Lo *step* finale della nostra indagine ha voluto indagare le relazioni intercorrenti tra l'espressione della gamma-glutamyltransferasi e il glutatione, noto come il più potente antiossidante presente nell'organismo, sia a livello ghiandolare mammario sia nel colostro bufalino, sia nel siero di vitelli che hanno assunto colostro. In accordo a quanto presente in letteratura, è stato ipotizzato un meccanismo che regola la produzione di GSH mediato dal sistema enzimatico della gamma-glutamyltransferasi; in particolare i nostri risultati avvalorano la

¹⁹⁵ Cfr: Baumrucker C.R. e Pocius P.A., 1978.

¹⁹⁶ Jang I. et al., 2000.

possibilità dell'esistenza di un ciclo gamma-glutamilico che presiede alla degradazione del glutatione. Questo dato ha un altissimo significato biologico se comparato al rilievo di elevati livelli di cisteina nel secreto mammario. La cisteina, secondo i nostri risultati potrebbe, dunque derivare dalla scissione del glutatione operata dalla gamma-glutamyltransferasi. Questa relazione getta le basi per lo studio accurato di queste relazioni, viste le importantissime implicazioni che ne deriverebbero. Un potenziamento dunque del sistema enzimatico delle gamma-glutamyltransferasi si renderebbe in tal modo responsabile del rilascio di maggiori quantità di amminoacidi essenziali nel secreto mammario, evento dai risvolti non sottovalutabili.

In conclusione, il chiarimento dei meccanismi molecolari con cui avviene l'*uptake* degli amminoacidi e il loro assorbimento potrebbe portare sicuramente ad un miglioramento della qualità della quantità delle proteine assorbite. Un potenziamento di tale sistema nel vitello bufalino, così come nelle femmine gravide, e come potrebbe applicarsi teoricamente in tutti i mammiferi, potrebbe incidere positivamente sul metabolismo proteico andando a ridurre costi aziendali conseguenti a supplementazioni dietetiche o a perdite economiche conseguenti a decessi successivi a patologie perinatali da inefficiente immunizzazione passiva. È noto infatti, il crescente interesse anche in medicina umana della ricerca sul colostro per le sue applicazioni in neonatologia, soprattutto per quei bambini che nascono prematuramente o con patologie del sistema immunitario.

Pertanto, oggi studi *in progress* che indagano il sistema enzimatico della gamma-glutamyltransferasi delineano che tale tematica riveste un forte interesse in quanto può applicarsi a numerosi settori scientifici con risvolti positivi nella pratica clinica.

6.2 Riferimenti bibliografici

- **Baumrucker C.R., Pocius P.A.:** Gamma - glutamyl transpeptidase in lactating mammary secretory tissue of cow and rat. *Journal of Dairy Science* 61:309-314, 1978.
- **Bilska A., Kryczyk, A., Wlodek L.:** The different aspects of the biological role of glutathione. *Postepy Hig Med Dosw;* 61:438-53, 2007.
- **Curthoys N.P.:** Role of gamma-glutamyltranspeptidase in the renal metabolism of glutathione. *Miner Electrolyte Metab.* 9(4-6):236–245, 1983.
- **Deng-Fu Yao, Zhi-Zhen Dong:** Hepatoma-related gamma-glutamyl transferase in laboratory or clinical diagnosis of hepatocellular carcinoma *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 6(1), 2007.
- **Dröge W., Breitkreutz R.:** Glutathione and immune function. *Proceedings of the Nutrition Society* 59: 595-600, 2000.
- **Finidori J., Laperche Y., Haguenaue-Tsapis R., Barouki R., Guellaen G., Hanoune J.:** In vitro biosynthesis and membrane insertion of gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem.* 259(8):4687–4690, 1984.
- **Johnston SL, Kitson KE, Tweedie JW, Davis SR, Lee J.:** Gamma-glutamyl transpeptidase inhibition suppresses milk protein synthesis in isolated ovine mammary cells. *J Dairy Sci.,* 87(2):321-9, 2004.

- **Kameoka M., Okada Y., Tobiume M.:** Intracellular glutathione as a possible direct blocker of HIV type 1 reverse transcription. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 12: 1635–8, 1996.
- **Lee D.H., Blomhoff R., Jacobs D.R. Jr.:** Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radic Res*; 38: 535–539, 2004.
- **Marmor M., Alcabes P., Titus S., Frenkel K., Krasinski K., Penn A.:** Low serum thiol levels predict shorter times-to-death among HIV-infected injecting drug users. *AIDS*, 11:1389-93,1997.
- **Matte, J.J., Girard C.L. Seoane, J.R.:** Absorption of colostral immunoglobulins G in the newborn dairy calf. *Journal of Dairy Science*, 65(9): 235-254, 1982.
- **Meister A., Anderson M.E.:** Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52:711-760, 1983.
- **Nash B., Tate S.S.:** In vitro translation and processing of rat kidney gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem*. 259(1):678–685, 1984.
- **Pandur S., Pankiv S., Johannessen M., Moens U., Huseby N.E.:** gamma-Glutamyltransferase is upregulated after oxidative stress through the Ras signal transduction pathway in rat colon carcinoma cells. *Free Radic Res*. 41 (12):1376-84, 2007.
- **Puente J. A., Varas M. A., Beckhaus G., Sapag-Hager M.:** γ -glutamyl transpeptidase activity and cyclic AMP levels in rat liver and mammary gland during the lactogenic cycle and in the oestradiol-progesterone pseudo-induced pregnancy. *FEBS Lett*. 99, 215-218, 1979.
- **Pocius P. A., Baumrucker C. R., McNamara J. P., Bauman D.E.:** gamma-glutamyl transpeptidase in rat mammary tissue. Activity during

- lactogenesis and regulation by prolactin. *Biochem. J.*, 188(2):565-568,1980.
- **Rico A. G.:** Metabolism of Endogenous and Exogenous Anabolic Agents in Cattle. *J Anim Sci.* 57:226-232, 1983.
 - **Siegrist S, Laperche Y, Chobert MN, Bulle F, Nakhasi HL, Guellaen G.:** Regulation of mouse mammary-gland gamma-glutamyltranspeptidase mRNA during pregnancy, lactation and weaning. *Biochem J.*1;267(3):621-4, 1990.
 - **Te Braake FW, Schierbeek H, de Groof K, Vermes A, Longini M, Buonocore G, van Goudoever JB.:** Glutathione synthesis rates after amino acid administration directly after birth in preterm infants. *Am J Clin Nutr.* 88(2): 333-9, 2008.
 - **Villa P., Saccani A., Sica A., Ghezzi P.:** Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense. *J Infect Dis.*, 185(8): 1115-20, 2002.
 - **Elferink J.G., de Koster B.M.:** Glutathione-induced enhancement of neutrophil locomotion. *Immunobiology* 184: 25-36, 1991.
 - **Viña J., Puertes I.R., Montoro J.B., Viña J.R.:** Effect of specific inhibition of gammaglutamyl transpeptidase on amino acid uptake by mammary gland of the lactating rat. *Letters* 159: 119 -122,1983.
 - **Vina J.R., Palacin M., Puertes I.R., Vina J.:** Role of the g-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation. *The American Physiological Society* 916-922, 1989.
 - **Viña J.R., Puertes I.R., Montoro J.B., Viña J.:** Effect of starvation and refeeding on amino acid uptake by mammary gland of the lactating rat.

Role of ketone bodies. *Biochemical Journal*, 216: 343 – 347, 1983.

- **Whitfield J.B.:** Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci*; 38: 263 – 355, 2001.
- **Zhang H., Forman H.J., Choi J.:** Gamma –Glutamyl Transpeptidase in Glutathione Biosynthesis. *Methods in Enzymology* 401: 426-449, 2006.